ISSN 0376—477X

中華農業研究

第四十八卷　第四期

目　次

山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究
……………………………劉新裕 張同吳 林義恭 陳淑芬 王昭月 朱戩良 王順成… 1
苦瓜果實構造及發育之研究
Ⅰ.苦瓜果實構造與受精過程…………………… 張有明 劉邦基 蕭吉雄 許圳塗 …23
γ-射線照射蔓綠絨組培苗莖段之誘變研究……………… 陳威臣 蕭翌柱 蔡新聲…32
彩虹鳥蕉組織培養之研究
Ⅲ.Cefotaxime和植物生長調節劑對莖頂培植體生育之影響
…………………………………………………………蕭翌柱 王才義 蔡新聲…42
以逢機增殖多型性 DNA(RAPD)進行火鶴花栽培種鑑定
與遺傳歧異性之研究……………………………………王昭月 莊耿彰 范明仁…52
泥炭苔對叢枝菌根菌繁殖之影響………………………………… 莊明富 程永雄…64
番椒(*Capsicum* spp.) 品系抗青枯病之篩選
………………………………… 林俊義 許秀惠 王三太 曹幸之 顏志恆 蕭吉雄…71
小菜蛾對BPU類生長調節劑及其他殺蟲劑交互抗性之研究……… 高靜華 鄭　允…84
應用影像處理技術分析噴霧覆蓋率之研究…………………邱相文 李芳繁 梁連勝…96

中華民國八十八年十二月

行政院農業委員會農業試驗所出版

中華民國　臺灣省　臺中縣　霧峰鄉

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 1～22 (1999)

山藥之品種特性、生產潛力、物化性質與抗氧化研究[1]

劉新裕 張同吳 林義恭 陳淑芬[2]
王昭月[3] 朱戩良[4] 王順成[5]

摘要：本研究針對13種山藥不同品種系塊莖之性狀與產量進行調查與比較，同時進行不同山藥塊莖物理與生化性質以及RAPD之分析，配合不同品種系塊莖抗氧化酵素活性之比較，可明確區分山藥品種系間各項特性之差異。本研究另以強迫餵食方式，進行台農2號山藥嫩芽之急性毒性測試，可確知山藥嫩芽是否安全無虞。本研究之試驗結果可供山藥品種篩選、栽培生產、加工與醫藥利用之參考。山藥不同品種系中以台農2號、大葉壽豐品系、二刺品系、大汕三品系及中國長品系等之塊莖產量表現最爲優異，公頃產量皆達34 t/ha以上，其中大汕三品系及二刺品系另具有很高之過氧化酵素活性；青森品系含有高量之P、K、Ca、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn，且塊莖亦具頗高之過氧化酵素活性，惟其產量僅爲8 t/ha。由山藥台農2號嫩芽對造成白鼠急性毒性之試驗結果可知，強迫餵食組之鼠隻均不產生任何臨床症狀，亦不造成白鼠死亡，台農2號之嫩芽可歸類爲無毒或少毒性類。利用篩選之隨機引子primer #31：5'TGTCCGGGTG3'，可在DNA層次明確區分山藥各品種系。經由RAPD分析所得之23條DNA片段中，其中3條，即587bp、834bp及1,045bp，在參試山藥15樣品之出現率依次爲73.3%、66.7%及80.0%，其他20條具有多型性差異特色，有11條僅存於單一山藥品種系中，可藉以鑑別山藥不同品種系；而片段587bp不存於青森、黃藥及大汕品系；基隆品系獨具956bp及1,123bp；黃藥品系獨具556bp及802bp，且強度皆在22以上，皆可利用來與其他山藥品種系區隔及判別。

關鍵詞：山藥、品種特性、生產、逢機增殖多型性DNA、抗氧化作用、急性毒性。

前　言

近年來，由於發現大部分的合成藥劑都有副作用，而且對於幾種慢性疾病如肝炎、癌症、高血壓及糖尿病等，仍無法達到根治可能，因此，天然藥用植物的開發與利用正受重視，傳統醫藥與民間驗方的價值與重要性，再度引起世人的普遍重視。山藥爲薯蕷科(Dioscoreaceae)薯蕷屬(*Dioscorea*)多年生

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所 研究報告第 1996 號。
2. 本所農藝系研究員、助理、助理研究員、計畫助理。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所作物種原室助理研究員。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
4. 本所農化系助理。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
5. 行政院農業委員會農業藥物毒物試驗所副所長。台灣省 台中縣 霧峰鄉。

蔓性根莖類植物，可供食用、藥用或保健利用，具高產及富含營養之特色。其利用部位爲塊莖(又稱擔根體)，有滋養、強壯及止瀉功效，爲常用藥用與保健用生藥材料。薯蕷屬植物除了係吾人糧食中澱粉及蛋白質之重要供源[6,21,23,24]外，在傳統醫藥方面，則係藥用植物相當被重視之一群植物。

山藥分佈極廣，遍及熱帶、亞熱帶及其他地區，物種十分繁雜[15,35,36,39]，栽培生產方式亦因地區或品種而異。山藥被栽培與利用之歷史極早，如「山海經」、「本草衍義」、「圖經本草」、「新修本草」、「本草綱目」及「齊民要術」等本草典籍均曾記載；最早之本草藥典「神農本草經」且列山藥爲上品藥材。全球山藥之年產量在1998年約爲30×10^6公噸，爲熱帶地區生產量僅次於樹薯及甘薯，且富營養價值之重要根莖作物，亦爲國際性重要糧食作物之一[27]。由於世界人口仍持續增長，人口成長快速，糧食益形不足，對於根莖作物，尤其是具有高產量及高營養價值之山藥之需求量似將愈大，因在單位時間及單位面積內，根莖作物及甘蔗同爲熱量能源生產最有效率之作物種類。若能及早選育山藥優良新品種，並建立其栽培技術，同時開發多元化新產品，似極符合目前正發展之農產品少量多樣化之農業政策，有助提高農民所得。

山藥由於栽培歷史悠久，許多種原係由原產地之地方品種演變而來，故種類很多，品系繁雜，形態變異頗大，生產力之差異亦大。在全球眾多山藥種原中，最具生產力的爲*D. alata* L.、*D. esculenta* (Lour.) Burk.、*D. rotundata* (L.) Poir.、*D. cayenensis* Lam.及*D. bulbifera* L.等。此外，世界上仍有不少其他重要之山藥種原，如*D. dumetorum Pax.*、*D. japonica Thunb.*、 *D. opposita Thunb.* 、 *D. pentaphylla* L.及*D. trifida* L.等。台灣較常見之山藥品種，多源自下列五種：(1)大薯又稱田薯(*D. alata*)，大薯原爲所有山藥中分佈最廣者，廣泛栽培於非洲、東南亞、中南美洲及局部歐洲；(2)長薯又稱家山藥*(D. batatas)*，原產大陸，較爲耐寒，可供藥用；(3)山薯又稱日本山藥*(D. japonica)*，原產日本，現栽培於大陸、日本及東南亞一帶；(4)條薯又稱紫田薯*(D. alata* L. var. *purpurea)*，現栽培於台灣中部；(5)恆春山藥又稱戟葉田薯*(D. doryophora)*，原產於台灣恆春半島一帶[19,20]。

我國農業正處於一轉型期之關鍵階段，在經濟與貿易自由化的趨勢之下，爲了順應潮流及加入世界貿易組織，國內現有栽培的作物種類，將受到國外相關產業不小的衝擊，其結果將造成農業經營上很大的困難。我們國內之農業結構必須加以調整，可朝向高價值、精緻化及多元化的方向發展。特用、藥用與保健植物之開發與利用，似極符合此種趨勢。台灣藥用與保健植物總數達二千種以上，其中不乏可資利用之種類，如山藥、金線連、山葡萄及麥門冬等。惟依據行政院衛生署85,5,25衛署食字第85024204號函，以及前農林廳86,3,20八六農特字第30713號函特別指明，各單位於引進供人食用之植物新品種前，應先了解並進行安全性評估後，再予推廣。爲保障消費者之權益，針對重要保健植物之開發與利用，實應先行評估並進行安全性測試，再考慮後續之研究與推廣工作。此外，衛生署初步研議45種可供膳食用的藥材，若廠商在產製食品中僅摻加這類藥材，可一律視爲食品，不再以藥品管理。這45種藥材分別是：人參、枸杞子、當歸、川芎、白芍、熟地、生地、黃耆、黨參、天麻、淡栥、蓮子、芡實、山藥、茯苓、山楂、烏梅、胡桃、松子、胖大海、百合、銀耳、白果、薤白、薏苡仁、黑棗、丁香、山奈、花椒、大茴、小茴、桂枝、桂皮、橘皮、冬蟲夏草、甘草、豆蔻、砂仁、紅棗、菊花、黃精、白朮、荷葉、酸棗仁、雞內金等。雖然山藥之塊莖已被視爲食品，安全無疑，但由塊莖所萌發之芽是否安全無慮，或是會像馬鈴薯般於萌芽時可能產生有毒物質，應先進行安全性測試，再考慮後續之研發與利用事宜。

生物細胞核的染色體係由不同的DNA緊密排列組合而成，其中某一段可能轉錄、轉譯、控制某個蛋白質之合成，進而控制某項生理機制的表現，我們稱之爲基因。DNA之鹽基雖只有A, T, C, G四種，但是經由不同之排列組合，每三個連續鹽基控制一種胺基酸之合成，不同胺基酸能製造各色各樣且功能各異之蛋白質，進而負責調控不同生理反應的進行。在DNA層次上可極穩定且明確區分生物之多樣

性差異特色。

控制蛋白質合成之基因，若受到體內自由基(free radical)，或環境及外在因子如輻射線、大氣污染物質如NO_2或O_3等、有機化合物如PCB或TCDD等、重金屬、化學物質或病毒等之攻擊[11]，會產生突變。由於基因之DNA產生變化，所合成之蛋白質就有可能產生變異，有些變異似乎無傷大雅，但有時只因一個胺基酸的改變，會發生極大之影響，例如正常紅血球細胞之血色素突變成鐮刀狀細胞(sickle cells)；目前所瞭解的老年性癡呆現象，也是因某個蛋白質產生變異所導致。若調節細胞分裂的基因產生變異而失控，細胞會不規則且不斷地進行分裂，即會產生所謂之癌症。

生物體內所產生的自由基對細胞或組織具有極大的殺傷力，幸而體內擁有分解及抑制其形成的防禦系統，例如細胞內含有如superoxide dismutase(SOD)、catalase、glutathione peroxidase 等抗氧化酵素群，能有效消除活性氧的活性，使之還原成安定之化學物質如H_2O等，惟此等修護作用會隨著年齡之增加而衰退；在細胞外另有不少抗氧化物質，可有效抑制自由基之產生與危害，例如Vit. E (tocopherol), Vit. C(ascorbate), tannin, alkaloids, chlorophyll, amino acids, amines, glutathione, carotenoids, flavonoids, phenolic acids, other phenols等[11,26,33]，上述抗氧化物質能迅速中斷脂質過氧化連鎖反應，分解並消除已形成的脂質過氧化物及自由基等有害物質。所有的抗氧化劑都有一共同點，即是可提供一個 .H，且提供後自身還大致安定。如果能控制過氧化物及自由基等有害物質，或控制導致氧活性化的物質的形成，將可使我們的壽命延長，更年輕、更健康、更強壯。

本研究之主旨在針對山藥不同品種系塊莖之性狀與產量進行調查比較，同時進行不同品種系塊莖物理與生化性質以及逢機增殖多型性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)之分析，配合不同品種系塊莖抗氧化酵素活性之評估比較，以明確區分山藥品種系間之差異。本研究另以強迫餵食方式，進行山藥嫩芽之急性毒性測試，藉以評估山藥嫩芽之安全性，供爲山藥品種篩選、栽培生產、加工與醫藥利用之參考。

材料與方法

一、 試驗材料

本所蒐集之薯蕷科薯蕷屬山藥物種種原，如*Dioscorea alata* L., D. *alata* L. var. *purpurea*(Roxb.) M. Pouch., *D. batatas* Decne., *D. esculenta*(Lour.) Burk., *D. rotundata*(L.) Poir., *D. bulbifera* L., *D. japonica* Thunb., *D. japonica* Thunb. var. *pseudojaponica*(Hay.) Yamam., *D. doryophora* Hance等約100品種系，由其中篩選下列18品種系(表1)，其中之1~13品種系爲主要供作試驗、分析與比較之材料，14~18供爲進行RAPD分析之對照材料。參試山藥名稱如下：1.中國長品系*(D. alata)*、2.二刺品系*(D. alata)*、3.大淮品系*(D. batatas)*、4.青森品系*(D. japonica)*、5.大葉壽豐品系*(D. alata)*、6.台農2號*(D. alata)*、7.大汕二品系*(D. alata)*、8.大汕三品系*(D. alata)*、9.基隆品系*(D. peudojaponica)*、10.北投品系*(D. alata)*、11.名間長紅品系*(D. purpurea)*、12.紫玉血薯品系*(D. purpurea)*、13.黃藥品系*(D. bulbifera)*、14.大汕一品系*(D. alata)*、15.屏地品系*(D. doryophora)*、16.法山品系*(D. esculenta)*、17.大蜜品系*(D.esculenta)*、18.青島品系*(D. batatas)*。

二、試驗步驟與方法

(一) 山藥不同品種系之品種特性與生產潛力之分析與比較：

1. 山藥不同品種系塊莖性狀與產量之比較：

1998年於本所農場進行前述材料1~13種山藥不同品種系比較試驗。種植方式爲塑膠穴管誘導法，半圓形穴管長100cm，周長20cm，以繩綁緊使上方開口約3cm寬，其內先裝填栽培介質：牛糞肥：蔗渣＝1：2，再於與地表僅有10^0 斜度之穴管前端種植薯塊，距穴管頂端約5 cm，種後覆

土。種植行株距爲140×30cm，即每公頃約23,800株，行長4m，試驗設計爲RCBD，三重複。種植後之田間管理悉依本所建議方式進行。調查項目爲單株塊莖收量、塊莖之粒數、長度、寬度、厚度及塊莖公頃產量等。調查株數爲每品種系隨機取樣10株，重複3次，以平均值表之，並以LSD法比較其差異之顯著性。

2.山藥不同品種系病蟲害罹病率之調查與比較：

病蟲害罹病率之調查與計算[23,24]：取樣方法爲每田區沿二對角線任取5點，計算距該點50cm範圍內所有罹病之病葉率。距該點50cm範圍內所有葉片之總數經估計後以550葉計。罹病率=罹病葉數/葉片總數×100%。

表1. 參試18種山藥品種系植物性狀簡介

Table 1. Introduction of botanical characters of 18 different *Dioscorea* spp.

No.	Var. & Lines	Chinese name	Tuber length	Flesh colour	Origin	Scientific name
1	80W02	中國長品系	long	white	China	*D. alata*
2	70W47	二刺品系	long	white	Taiwan	*D. alata*
3	70W59	大淮品系	long	white	China	*D. batatas*
4	70W49	青森品系	long	white	Japan	*D. japonica*
5	70W42	大葉壽豐	long	white	Taiwan	*D. alata*
6	TNG2	台農2號	middle	white	Taiwan	*D. alata*
7	70W34	大汕二品系	middle	white	China	*D. alata*
8	70W35	大汕三品系	middle	white	China	*D. alata*
9	70W43	基隆品系	long	white	Taiwan	*D. peudojaponica*
10	70W48	北投品系	long	white	Taiwan	*D. alata*
11	70R20	名間長紅	middle	red	Taiwan	*D. purpurea*
12	70R16	紫玉血薯	middle	red	Taiwan	*D. purpurea*
13	70W37	黃藥品系	short	yellow	Taiwan	*D. bulbifera*
14	70W33	大汕一品系	short	white	China	*D. alata*
15	70W20	屏地品系	long	white	Taiwan	*D. doryophora*
16	86W01	法山品系	short	white	France	*D. esculenta*
17	70W19	大蜜品系	short	white	Africa	*D. esculenta*
18	70W71	青島品系	middle	white	China	*D. batata*

(二) 山藥不同品種系之物理與生化性質之測定與比較：

1. 山藥不同品種系物性測定與比較[16]：

利用英製Stable Micro System 食品物性測定儀(Texture Analyzer)進行測試，其物性測定之條件如下：Probe NO.P/2N，測定之薯塊高度爲1㎝(不包括薯皮)，Graph Type：Force v Time，Force Threshold 20g，Acquisition Rate 200pps，Force Units Grams，Contact Area 1.00(㎜^{2})，Contact Force 5.0g， Pro-Test speed 3.0(㎜/s)，Test speed 1.0(㎜/s)， Post-Test speed 10.0(㎜/s)， Distance 2.0(㎜)，Time 3(s)，Trigger Type Auto 5(g)。分析項目爲：塊莖之彈性(springiness)，凝集性(cohesiveness)，咀嚼感(chewiness)，膠質感(gumminess)與硬度(hardness)等。分析過程中每處理3重複，以平均值表之，並以LSD法比較其差異之顯著性。

2.山藥不同品種系塊莖肉質部分礦物質含量之測定與比較：

礦物質含量之測定乃樣品於灰化(灰化溫度爲550℃)後，以3N HCl溶解並以0.2N HCl定量至50ml，利用感應耦合電漿-原子發射光譜分析儀，即ICP(Inductively Coupled Plasma-Atom Emission

Spectrophotometer, ICP-AES, Jobin-Yvon JY 38type III)分析，分析項目分爲(1)必需元素，即P, K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Cr, Ni等共10種，(2)有害重金屬元素，即 Cd, Pb等共2種。分析過程中每處理隨機取樣山藥塊莖乾粉2g，2~3重複，再以平均值表示之。

3. 山藥抗氧化特性之測定與比較[3,17,26,29]：

(1)塊莖L、a、b值係利用Color Difference Meter(Tokyo Denshoku Inc, Co., LTD, Japan)測定。L值代表明亮度，+a值代表紅色度，+b值代表黃色度。

(2)酵素萃取：稱取山藥塊莖鮮重2 g，加入5ml萃取緩衝液(0.1M 磷酸緩衝液，pH=7.0)，及少許海砂，在冰浴下研磨。之後在2℃、12,000rpm下離心20分鐘，取上澄清液備用。

(3)過氧化酵素(Peroxidase, PO)活性測定：取上澄清液0.5ml，加入3.6×10^{-3} M guaiacol 緩衝液(0.04 ml guaiacol 原液加入100 ml 0.1 M 磷酸緩衝液，pH=6.0)及0.0135 M H_2O_2，迅速混合後，放入Spectrophotometer中測其在470nm 波長下之反應速率(ABS/min)。

(4)多酚氧化酵素(Polyphenol oxidase, PPO)活性測定：取上澄清液0.2ml，加入0.1M 磷酸緩衝液(pH=8.0)及0.5 M Catechol 0.2ml，迅速混合後，放入Spectrophotometer中測其在420nm 波長下之反應速率(ABS/min)。

(5)總酚類化合物含量測定：取上澄清液 0.2ml，加入去離子水 0.8ml，再加入Folin Ciocalteus reagent 0.1 ml，20％Na_2CO_3 2ml，去離子水8.7ml，充分混合均勻後，在沸水浴中加熱三分鐘，取出後迅速冷卻，放入Spectrophotometer中測其在660nm 波長下之吸收值。標準溶液爲20~120 ug/ml之caffeic acid 。

(三)不同山藥品種系RAPD分析與鑑別：

參試材料共計15樣品，依次如下：1.青森A品系(代號70W49A)、2.大淮A品系(代號70W59A)、3.青森B品系(代號70W49B)、4.大淮B品系(代號70W59B)、5.屏地品系(代號70W20)、6. 基隆A品系(代號70W43A)、7.基隆B品系(代號70W43B)、8.法山品系(代號86W01)、9.中國長品系(代號80W02)、10.二刺品系(代號70W47)、11.台農2號(代號TNG2)、12.大蜜品系(代號70W19)、13.黃藥品系(代號70W37)、14.大汕品系(代號70W33)、15.青島品系(代號70W71)。

1. 山藥DNA之萃取：取不同山藥品種系之葉片0.2g，加入液態氮研磨成粉末，再加入600ul的CTAB(hexadecyltrimethyl-ammonium bromide) extraction buffer(1.4M NaCl、2 ％CTAB、100mM Tris-HCl pH8.0、20mM EDTA及0.2％ β- mercaptoethanol)，置於65℃水浴中30分鐘，再加入600ul chloroform/ isoamyl alcohol(24:1,V/V)，於20℃離心14,000 rpm 10分鐘後，取上清液加入十分之一倍體積的10％CTAB混合均勻，重複水浴後之步驟，再加入等倍體積的CTAB precipitation buffer(1％ CTAB、50mM Tris pH8.0、10mM EDTA pH8.0)，置於冰上30分鐘。離心後pellet再溶於high-salt TE buffer(10mM Tris-HCl pH8.0、1mM EDTA pH8.0、1M NaCl)，加上二倍體積95％酒精混合均勻，離心後再以80％酒精清洗一次，經眞空乾燥後溶於TE緩衝液，保存於4℃，供RAPD分析之用。

2. 聚合酵素連鎖反應(PCR)：將萃取得之DNA濃度先稀釋成5ng/ul，置於-20℃下，供進行PCR時，作爲模版DNA。利用10個核啓酸序列的隨機引子35種(國立台大農藝系林順福博士提供)，進行聚合酵素連鎖反應。反應總體積爲25ul，內含1 unit Taq polymerase(Promega)，1xPCR buffer(50 mM KCl、10 mM Tris-HCl pH9.0、0.1％Triton 100)(Promega)、2.5mM MgCl2、0.2mM dNTP、0.2uM primer及25ng template DNA。PCR儀器爲Touch Down(HYBAID)，反應溫度設定：第1個cycle含94℃ 3分鐘、37℃ 1分鐘及72℃ 1分鐘，接著39個cycle含94℃1分鐘、37℃1分鐘、72℃2分鐘，第41個cycle含94ΥC1分鐘、37ΥC1分鐘及72ΥC10分鐘。反應結束時保存於4℃，以備電泳分析。

3. 電泳分析與DNA多型性片段檢視：經PCR增殖之DNA，取12ul加入6倍的電泳緩衝液(6x loading buffer:0.25% bromophenol blue、xylene cyanol、40%w/v sucrose)、以2%的agarose在TAE buffer(40mM Tris acetate pH 8.0、1mM EDTA)中進行電泳。電泳儀器採用Mupid-2，電壓設定100伏特，電泳時間約30分鐘，結束後置於0.5mg/ml 的ethidium bromide中染色20-30分鐘，再置於UV光箱中，檢視agarose 膠體上DNA多型性片段，之後照相，並貯存膠片影像於IS1000 Digital Imaging System(Alpha Innotech Corporation)中，進行影像分析。
4. 山藥不同品種系之鑑別：利用具有多型性表現之引子，分析各品種系間DNA條帶數目與位置之差異性，可藉由特殊的DNA片段來明確區別及鑑定各品種系(38)，供日後育種與生產利用研究之重要參考。

(四)山藥嫩芽急性毒性測試：

針對山藥嫩芽造成白鼠之口服急毒性試驗，期間起自1998年三月至同年五月，地點在農業試驗所與農業藥物毒物試驗所同時進行，所有試驗流程均依循美國環保署毒物藥物試驗準則，及試驗優良規範程序處理[28,30,31]。

1. 供試藥劑：秤取台農2號山藥嫩芽鮮重100g，加純水400cc，煮沸二小時，其濾液呈淺褐色液劑。
2. 供試動物：五週齡大之Wistar品系白鼠，購自國科會動物中心，在農業藥物毒物試驗所動物飼育室觀察一週，經檢疫後，取體重相近之健康成鼠進行試驗。試驗動物除了在處理前3小時及處理後4小時禁食外，平時每籠放置2隻，給與充足之飼料(Rodent Laboratory Chow 5001＃)及飲水。動物飼育室之環控狀況為溫度25±1℃、濕度50-70%及12小時光/12小時暗之光照週期。

3.步驟與方法：

(1) 試驗包括對照組及單一濃度之試驗組，測試濃度以最高限劑量5,000 mg/kg處理，對照組僅含蒸餾水，不含任何藥劑。
(2) 以塑膠針管套上胃管(直徑2.25㎜，長度95.0㎜)，將試劑強迫餵食白鼠。
(3) 在處理後1/2、1、2及4 小時，記錄體重變化或中毒症狀、症狀發生、復原及死亡時間；自處理後第2天起，每日觀察1次，至處理後第14天止。
(4) 死亡鼠隻立即進行解剖，並進行肉眼病理檢查。
(5) 各試驗組所得數據以Probit analysis分析，求取LD_{50}，另比較試驗組與對照組之體重變化，及分析其顯著性差異($p<0.05$)。

結　果

(一)山藥不同品種系之品種特性與生產潛力之分析與比較

1.山藥不同品種系塊莖性狀與產量之比較：

於1998年在台中本所農場進行不同品種系山藥塊莖性狀與產量之比較，結果如表 2及圖 1所示。單株薯塊收量最大者為二刺品系(70W47)、台農2號(TNG2)、大汕三品系(70W35)及中國長品系(80W02)，此4品種系塊莖之收量介於1,680~2,329g；其次為大葉壽豐品系(70W42)之1,592g，最小者為大淮品系(70W59)之222g，其間之差異顯著。單株薯塊數目最多者為中國長品系之6粒，台農2號為2.4粒，粒數最少者為大汕二品系(70W34)之1.4粒及黃藥品系(70W37)之1.3粒。塊莖最長的為二刺品系(70W47)之59.7cm，最短的為黃藥品系(70W37)之13.7cm。塊莖最寬的為黃藥品系之17cm，其次為名間長紅品系(70R20)之11.1cm，最窄的為大淮品系之1.7cm，僅為黃藥品系之1/10寬。塊莖最厚的為黃藥品系之67.4mm，較薄的為基隆品系(70W43)、青森品系(70W49)及大淮品

系。在這些山藥品系中，有6品系之塊莖單粒最大收量高於1,000g，最大粒爲台農2號之1,403g(表2)。在公頃產量方面，13種山藥參試品種系中，有3品系之塊莖公頃產量高於41t/ha，有2品系之塊莖公頃產量高於33t/ha，有5品系之塊莖公頃產量介於25.5~29.2t/ha，另有3品系之塊莖公頃產量低於10t/ha，公頃產量最高者爲台農2號之45.6 t/ha，最低者爲大淮品系之4.4 t/ha，產量之差異顯著(圖 1)。

表2. 山藥不同品種系塊莖性狀與收量之比較

Table 2. Comparison on the tuber characters and yield among different varieties and lines of *Dioscorea* spp.

No.	Var. & Lines	Tuber (No./pl.)	Tuber wt. (g)	Tuber length(cm)	Tuber width (cm)	Tuber thick.(mm)	Largest tuber wt. (g)
1	80W02	6.0 a[z]	1,680 a	31.3 bcd	6.2 def	44.6 de	838 abc
2	70W47	3.7 bc	2,329 a	59.7 a	7.0 cde	42.9 e	1,297 a
3	70W59	1.3 d	222 c	21.6 de	1.7 g	14.5 f	212 c
4	70W49	2.1 cd	366 bc	32.5 bcd	2.5 fg	22.7 f	268 bc
5	70W42	2.2 cd	1,592 ab	32.9 bcd	8.9 bcde	63.7 ab	1,205 a
6	TNG2	2.4 cd	2,042 a	33.7 bcd	10.1 bcd	62.0 ab	1,403 a
7	70W34	1.4 d	1,273 abc	44.2 b	6.1 ef	51.3 bcde	906 abc
8	70W35	2.3 cd	1,860 a	34.1 bcd	7.9 bcde	57.0 abcde	1,212 a
9	70W43	1.6 cd	327 bc	36.9 bc	2.4 fg	19.7 f	291 bc
10	70W48	5.3 ab	1,461 abc	26.0 cde	6.8 cde	45.1 cde	760 abc
11	70R20	2.2 cd	1,435 abc	22.9 cde	11.1 b	58.2 abcd	984 ab
12	70R16	2.0 cd	1,325 abc	20.8 de	10.2 bc	59.0 abc	1,069 ab
13	70W37	1.3 d	1,160 abc	13.7 e	17.0 a	67.4 a	1,013 ab

[z]Means followed by the same letter within each column are not significantly different at 5% level by the LSD test.

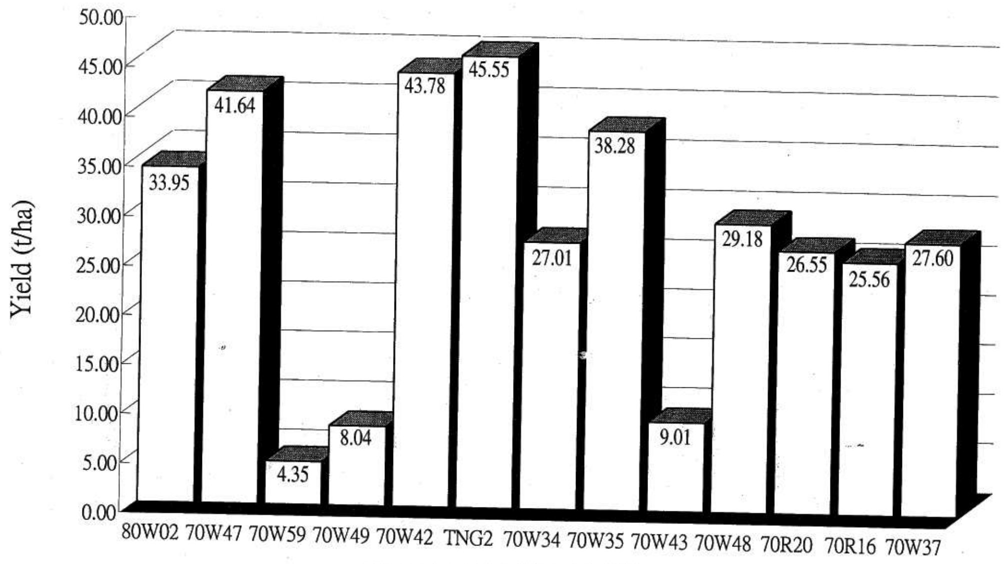


圖1. 不同山藥塊莖產量之比較。

Fig. 1. Comparison on tuber yield of various yams.

2. 山藥不同品種系病蟲害罹病率之調查：

山藥之主要病害有炭疽病、莖枯病、雲紋病等。氮肥施用過量且排水不良時，易於引發炭疽病，炭疽病爲目前台灣山藥最常見且最嚴重的病害；莖枯病一般經由水傳播病原，長期下雨後易發病，病徵爲由莖基部呈黑褐色環狀病斑，嚴重時破壞輸導組織，全株枯死；雲紋病之病徵爲葉片上呈雲白色病斑。在參試之13種山藥品種系中，以二刺品系(70W47)及大汕三品系(70W35)之病害罹病率較高，達12.9%；其次爲紫玉血薯品系(70R16)之11.1%，及大汕二品系(70W34)與名間長紅品系(70R20)之9.1~9.3%；而以黃藥品系(70W37)、中國長品系(80W02)、大淮品系(70W59)、青森品系(70W49)及大葉壽豐品系(70W42)之病害罹病率較低，其中之黃藥品系僅2.3%(圖 2)。

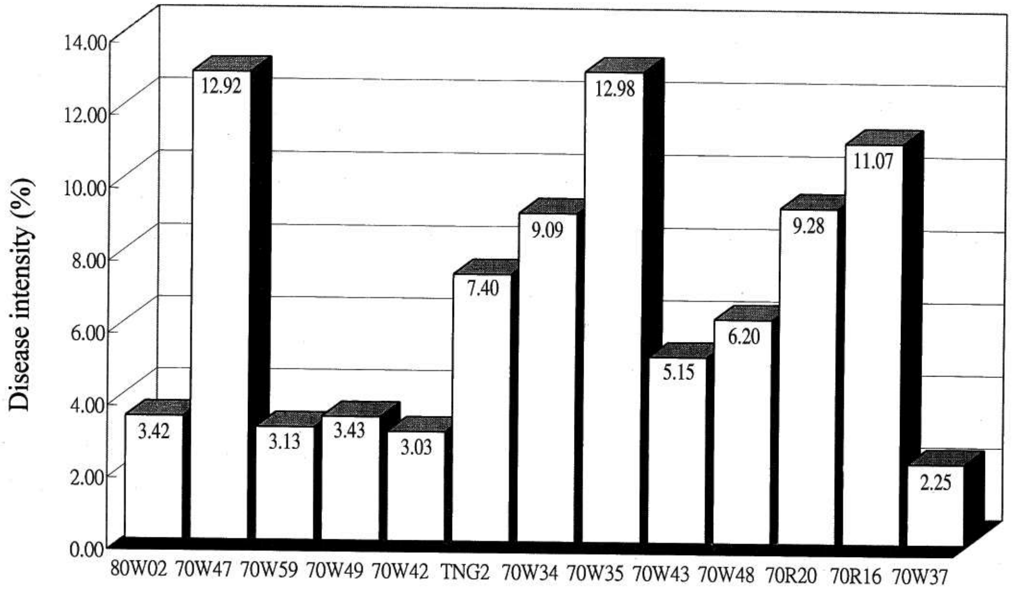


圖 2. 不同山藥炭疽病罹病率之比較。

Fig. 2. Comparison on anthacnose intensity (%) of various yams.

蟲害中以盲椿、蚜蟲、甲蟲、夜盜蟲、螻蛄、天蛾幼蟲、毒蛾幼蟲及紅蜘蛛爲主，以盲椿、夜盜蟲及紅蜘蛛之危害較嚴重，但一般而言並不構成大害。在13種山藥品種系中，以二刺品系(70W47)之蟲害罹病率較高，達34.9%；其次爲中國長品系(80W02)之29.7%及黃藥品系之29.4%，以及紫玉血薯品系(70R16)之19.3%；其餘有8品種系如台農2號(TNG2)等之蟲害罹病率介於12.4~15.1%之間，而以名間長紅品系(70R20)之蟲害罹病率最低，僅11.1%(圖 3)。

(二)山藥不同品種系之物理與生化性質之測定與比較

1.山藥不同品種系塊莖之物性測定：

利用英製Stable Micro System 食品物性測定儀，進行山藥去皮塊莖物性結構之測試結果如表3所示。參試山藥13品種系塊莖之彈性(springiness)介於0.29~0.96之間，凝集性(cohesiveness)介於

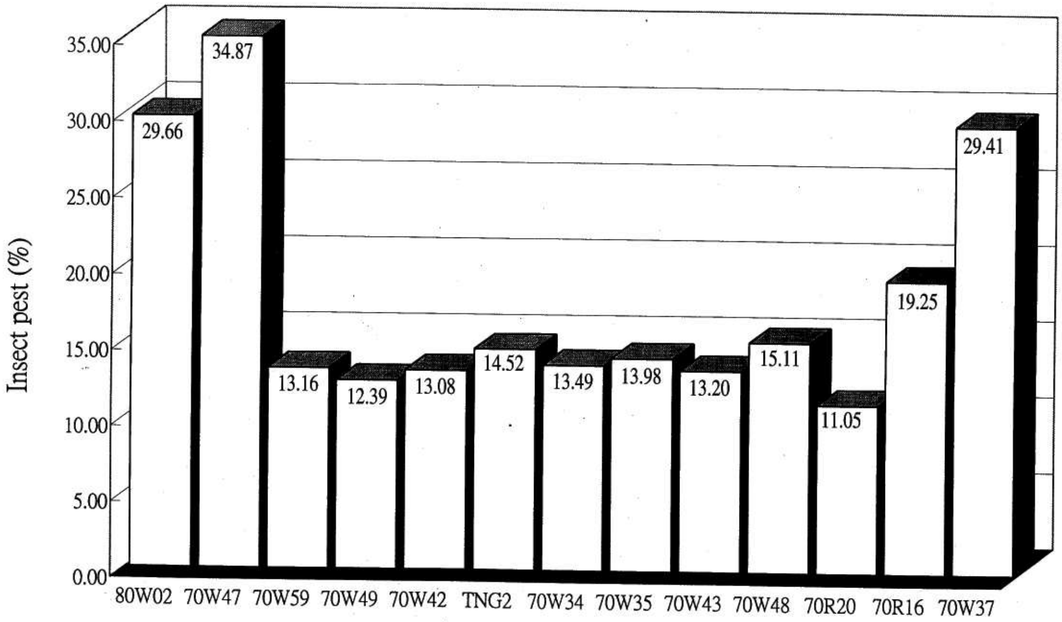


圖 3. 不同山藥蟲害罹病率之比較。

Fig. 3. Comparison on insect pest intensity of various yams.

0.17~0.41之間，此二者在13種山藥品種系間之差異皆不顯著。但在咀嚼感(chewiness)方面，則以黃藥品系(70W37)之33.2最高，其次爲大汕二品系(70W34)之15.1，兩者差異顯著，其餘值更小，介於10.8～4.0之間。在膠質感(gumminess)方面，亦以黃藥品系之66.4最高，其次爲大汕二品系之31.5，兩者差異顯著，其餘則介於28.4～13.7之間。在硬度(hardness)方面，亦以黃藥品系之224.8最高，其次爲大汕二品系之143.5，兩者差異顯著，其餘之硬度值更小，介於124.6~70.5之間(表3)。

表3. 不同山藥品種系塊莖物性結構之比較

Table 3. Comparison on the tuber texture among different varieties and lines of *Dioscorea* spp.

No.	Var. & Lines	Springiness	Cohesiveness	Chewiness	Gumminess	Hardness
1	80W02	0.34	0.20	7.70 bc [z]	22.21 bcd	111.13 bcd
2	70W47	0.30	0.20	4.12 c	13.73 d	71.43 d
3	70W59	0.96	0.17	4.01 c	13.76 d	80.70 cd
4	70W49	0.33	0.24	10.81 bc	28.35 bc	122.73 bc
5	70W42	0.37	0.17	7.72 bc	20.48 bcd	124.60 bc
6	TNG2	0.29	0.19	4.31 c	13.77 d	70.47 d
7	70W34	0.43	0.21	15.12 b	31.46 b	143.47 b
8	70W35	0.32	0.41	5.65 c	17.84 bcd	89.97 cd
9	70W43	0.32	0.20	6.86 bc	21.44 bcd	107.43 bcd
10	70W48	0.29	0.35	5.80 c	18.04 bcd	89.07 cd
11	70R20	0.30	0.19	4.68 c	15.82 cd	85.80 cd
12	70R16	0.41	0.22	9.74 bc	24.09 bcd	110.70 bcd
13	70W37	0.50	0.29	33.24 a	66.44 a	224.83 a

[z]Means followed by the same letter within each column are not significantly different at 5% level by the LSD test.

2.山藥不同品種系塊莖肉質部分礦物質含量之比較

利用感應耦合電漿-原子發射光譜分析儀，進行10種必需元素及2種有害重金屬元素分析之結果如表4a與4b所示。在P、K、Ca、Mg方面，參試山藥品種系塊莖乾粉P之含量以青森品系(70W49)最高，達0.22%，其次爲台農2號(TNG2)之0.21%，含量最低者爲北投品系(70W48)之0.07%及名間長紅(70R20)之0.09%；K之含量以台農2號(TNG2)最高，達1.52%，其次爲青森品系(70W49)之1.48%，含量最低爲二刺品系(70W47)之0.96%；Ca之含量以大淮品系(70W59)之0.15%最高，其次爲青森品系(70W49)之0.13%，含量最低爲二刺品系(70W47)、大汕三品系(70W35)、北投品系(70W48)、名間長紅(70R20)及紫玉血薯(70R16)，低至無法偵測；Mg之含量以大淮品系(70W59)及青森品系(70W49)之含量最高，達0.12%，其次爲大葉壽豐品系(70W42)及基隆品系(70W43)，含量爲0.1%，其餘含量介於0.08~0.04%(表4a)。

表4a. 不同山藥品種系塊莖必需礦物元素含量之比較

Table 4a. Comparison on the essential element contents of each tuber among different varieties and lines of *Dioscorea* spp.

No.	Var.& lines	Plant part	P%	K%	Ca%	Mg%	Fe(ppm)	Mn(ppm)	Cu(ppm)	Zn(ppm)
1	80W02	Tuber	0.12	1.04	0.02	0.08	43.75	0.25	6.13	12.65
2	70W47	Tuber	0.11	0.96	2	0.04	59.50	0.50	4.03	9.85
3	70W59	Tuber	0.18	1.24	0.15	0.12	173.25	10.50	3.35	18.80
4	70W49	Tuber	0.22	1.48	0.13	0.12	211.25	10.25	4.13	26.23
5	70W42	Tuber	0.15	1.10	0.07	0.10	200.75	4.50	3.58	14.80
6	TNG2	Tuber	0.21	1.52	0.04	0.06	97.25	1.75	9.85	11.95
7	70W34	Tuber	0.12	1.20	0.04	0.05	59.00	4.25	4.18	11.68
8	70W35	Tuber	0.11	1.34	-[z]	0.05	51.25	0.75	2.68	11.30
9	70W43	Tuber	0.16	1.13	0.09	0.10	106.00	2.50	3.88	16.58
10	70W48	Tuber	0.07	1.09	-	0.04	38.50	0.75	4.40	14.70
11	70R20	Tuber	0.09	1.23	-	0.05	21.50	0.50	2.98	12.40
12	70R16	Tuber	0.10	1.15	-	0.04	47.50	0.25	3.30	11.48
13	70W37	Tuber	0.15	1.21	0.01	0.08	1,504.50	15.00	4.40	16.23

[z]not detected.(N.D. means concentration under detectable limit.)

在Fe、Mn、Cu、Zn方面，參試山藥品種系塊莖乾粉Fe之含量以黃藥品系(70W37)最高，高達1,505ppm，其次爲青森品系(70W49)之 211ppm，含量最低爲名間長紅(70R20)之21.5ppm；Mn之含量亦以黃藥品系(70W37)最高，達15 ppm，其次爲大淮品系(70W59)之10.5 ppm與青森品系(70W49)之10.3 ppm，含量最低爲中國長品系(80W02)與紫玉血薯(70R16)之0.25 ppm；Cu之含量以台農2號(TNG2)最高，達9.85 ppm，其次爲中國長品系(80W02)，含量達6.13 ppm，含量最低爲名間長紅(70R20)之2.98 ppm； Zn之含量以青森品系(70W49)最高，達26.23 ppm，其次爲基隆品系(70W43)及黃藥品系(70W37)，含量皆達16 ppm以上，含量最低爲二刺品系(70W47)之9.85 ppm(表4a)。

在Cd、Cr、Ni、Pb方面，參試13種山藥塊莖乾粉中Cd之含量以黃藥品系(70W37)最高，達0.18ppm，其次爲青森品系(70W49)之0.10 ppm，其餘之含量皆不高，含量低至無法偵測者爲北投品系(70W48)及名間長紅(70R20)；Cr之含量以黃藥品系(70W37)最高，達5.7 ppm，其次爲大葉壽豐品系(70W42)之2.45 ppm，含量最低爲北投品系(70W48)之0.46 ppm及二刺品系(70W47)之0.48 ppm；Ni之含量亦以黃藥品系(70W37)最高，達4.28 ppm，其次爲青森品系(70W49)與大葉壽豐品系(70W42)，含量約2.5~2.7ppm，含量最低爲二刺品系(70W47)之0.45 ppm； Pb之含量以中國長品系(80W02)較高，達0.78 ppm，其次爲大汕二品系(70W34)之 0.16 ppm，其餘之含量皆不高，大部分低至無法偵測(表4b)。

表4b. 不同山藥品種系塊莖重金屬元素含量之比較

Table 4b. Comparison on the contents of heavy metal elements of different varieties and lines of *Dioscorea* spp.

No.	Var. & Lines	Plant part	Cd(ppm)	Cr(ppm)	Ni(ppm)	Pb(ppm)
1	80W02	Tuber	0.03	1.01	0.86	0.78
2	70W47	Tuber	0.03	0.48	0.45	-[z]
3	70W59	Tuber	0.06	0.88	1.05	-
4	70W49	Tuber	0.10	1.53	2.68	-
5	70W42	Tuber	0.03	2.45	2.45	-
6	TNG2	Tuber	0.04	1.55	1.35	0.05
7	70W34	Tuber	0.02	1.10	1.11	0.16
8	70W35	Tuber	0.03	0.65	0.77	-
9	70W43	Tuber	0.03	1.00	1.85	-
10	70W48	Tuber	-	0.46	1.11	-
11	70R20	Tuber	-	1.38	1.08	-
12	70R16	Tuber	0.03	0.93	1.57	-
13	70W37	Tuber	0.18	5.70	4.28	-

[z] not detected(N.D. means concentration under detectable limit.)

3.山藥抗氧化特性之測定與比較：

(1)塊莖L、a及b值：山藥13品種系塊莖之L值一般介於70-80之間，以基隆品系(70W43)之L值最大(83)，其次爲二刺品系(70W47)、大淮品系(70W59)、青森品系(70W49)及台農2號(TNG2)，L值皆達79以上，而以名間長紅(70R20)之L值最小(49)，其次之黃藥品系(70W37)之L值爲68，而同爲紅肉之紫玉血薯(70R16)之L值爲75，不低於白肉之大汕三品系(73)。去皮30分鐘後，L_0與$L_{1/2}$變化最小者爲青森，其L值不降反升，大汕三品系(70W35)、大汕二品系(70W34)、基隆品系(70W43)、大葉壽豐品系(70W42)與紫玉血薯(70R16)等5品種系L值之降幅亦小(圖7)。

參試山藥白肉類塊莖之a值一般介於-3～-9之間，紅肉類塊莖之a值介於9～3之間，黃肉類塊莖之a值爲-9。以名間長紅(70R20)之a值最大，以北投品系(70W48)之a值最小。去皮30分鐘後，a_0與$a_{1/2}$變化最小者爲大汕三品系(70W35)，變化最大者爲黃藥品系(70W37)(圖8)。

參試山藥白肉類品種系之b值一般介於15～8之間，紅肉類塊莖之b值介於3～-2之間，黃肉類塊莖之b值則爲20，以黃藥品系(70W37)之b值最大，以名間長紅(70R20)之b值最小。去皮30分鐘後，b_0與$b_{1/2}$變化最小者爲大淮品系(70W59)，變化最大者爲二刺品系(70W47)與黃藥品系(70W37)(圖9)。

(2)山藥塊莖過氧化酵素(PO)活性之比較：山藥13品種系塊莖PO活性之差異頗大，PO活性最大者爲黃藥品系(70W37)之1.54(ΔOD/ g. fw/min)，其次爲大汕三品系(70W35)之1.42、青森品系(70W49)之1.36、二刺品系(70W47)之1.34與名間長紅(70R20)之1.33；PO活性最小者爲台農2號(TNG2)之0.09，黃藥品系之PO活性約爲台農2號之17倍(圖4)。

(3)山藥塊莖多酚氧化酵素(PPO)活性之比較：參試山藥塊莖PPO活性之差異亦大，PPO活性最大者爲二刺品系(70W47)之21.9(ΔOD/ g. fw/min)，次爲紫玉血薯(70R16)之19.6，以及北投品系(70W48)之17.4與台農2號(TNG2)之17.1；PPO活性最小者爲青森品系(70W49)之0.76，二刺品系之PPO活性約爲青森品系之28.8倍(圖5)。

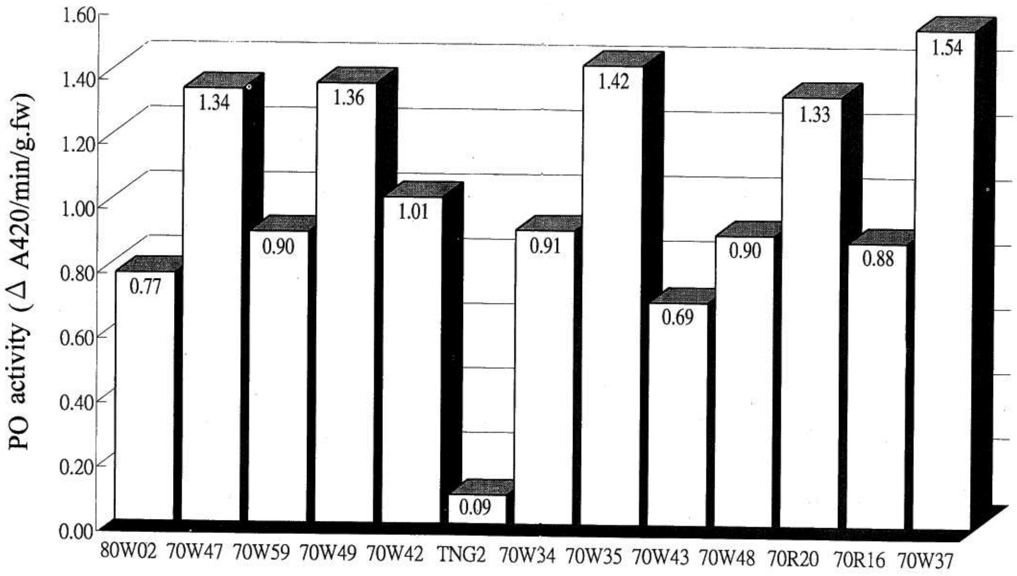


圖 4. 不同山藥過氧化酵素活性之比較。

Fig. 4. Comparison on peroxidase(PO)actvity of various yams.

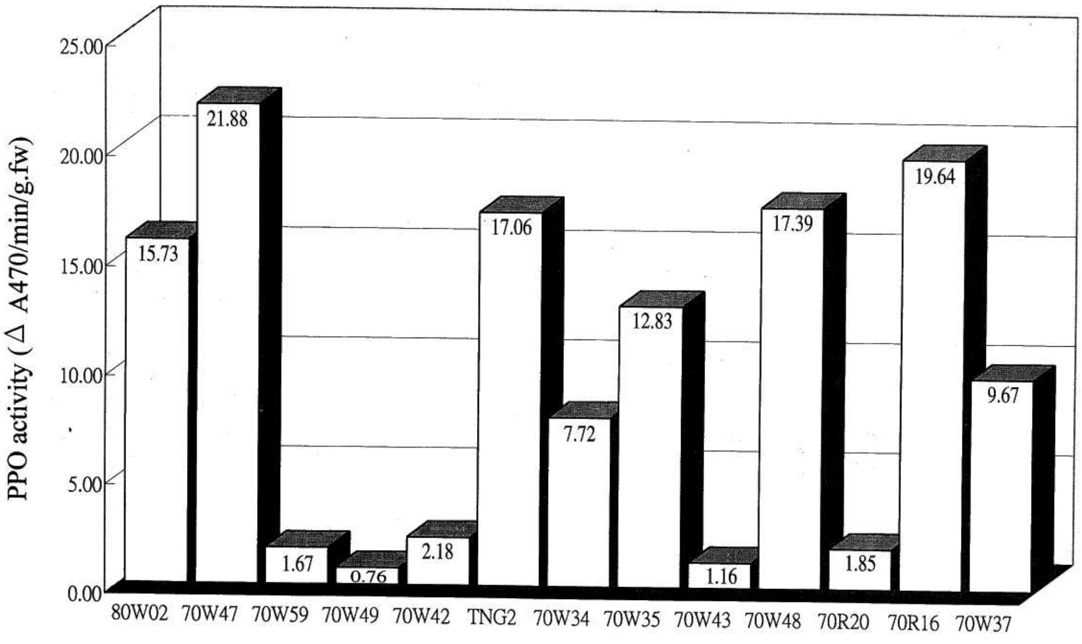


圖 5. 不同山藥多酚氧化酵素活性之比較。

Fig. 5. Comparison on polyphenol oxidase(PPO)activity of various yams.

(4)山藥塊莖總酚類化合物(TPC)含量之比較：參試山藥白肉類品種系塊莖之總酚類化合物含量介於1,365-2,427(ug caffeic acid/g. fw)之間，紅肉類品種系塊莖之總酚類化合物含量介於2,620~3,194之間，黃肉類塊莖之含量爲2,755。參試山藥中以紫玉血薯(70R16)之TPC含量最大，以青森品系(70W49)最小(圖6)。

(三)山藥不同品種系之RAPD分析及鑑別

利用本所現有10個核苷酸序列的隨機引子35種，進行聚合酵素連鎖反應，初步發現隨機引子primer #31：5'TGTCCGGGTG3'，可大致分辨山藥各品種系間之差異(圖10)。山藥不同品種系植株之DNA經萃取後，利用primer #31進行PCR反應，參試山藥不同品種系各別呈現之DNA條帶數介於4-8條(表5)。經由RAPD分析所得之DNA片段總數爲23條(表 6)，其中3條之出現率較高且清晰，即587bp, 834bp及1,045bp，在參試山藥15樣品之出現率依次爲73.3%、66.7%及80.0%，以前2條DNA片段較爲清晰，其條帶強度最高可達52(序號12之大蜜品系)或51(序號1之青森A品系)；1,045bp以後之條帶不清晰強度概在14以下。其他20條DNA片段較具多型性差異特色，其中有11條僅存在於單一山藥品種系中，雖然有些條帶強度不夠，仍可藉此與其他山藥樣品區隔；587bp之片段不存於青森、黃藥及大汕品系；基隆品系獨具956bp及1,123bp，雖然有些後者之強度只爲3；黃藥品系獨具556bp及802bp，且強度皆在22以上(表 6)，這些條帶皆可利用來判別不同山藥品種系。

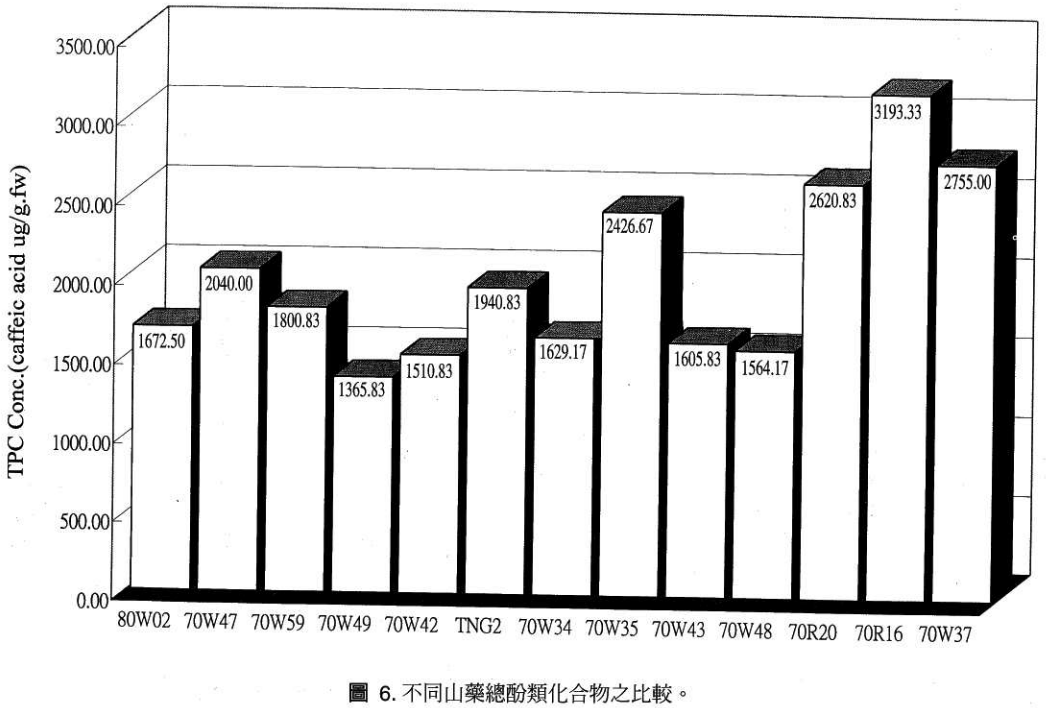


圖 6. 不同山藥總酚類化合物之比較。

Fig. 6. Comparison on total phenolic compound(TPC)of various yams.

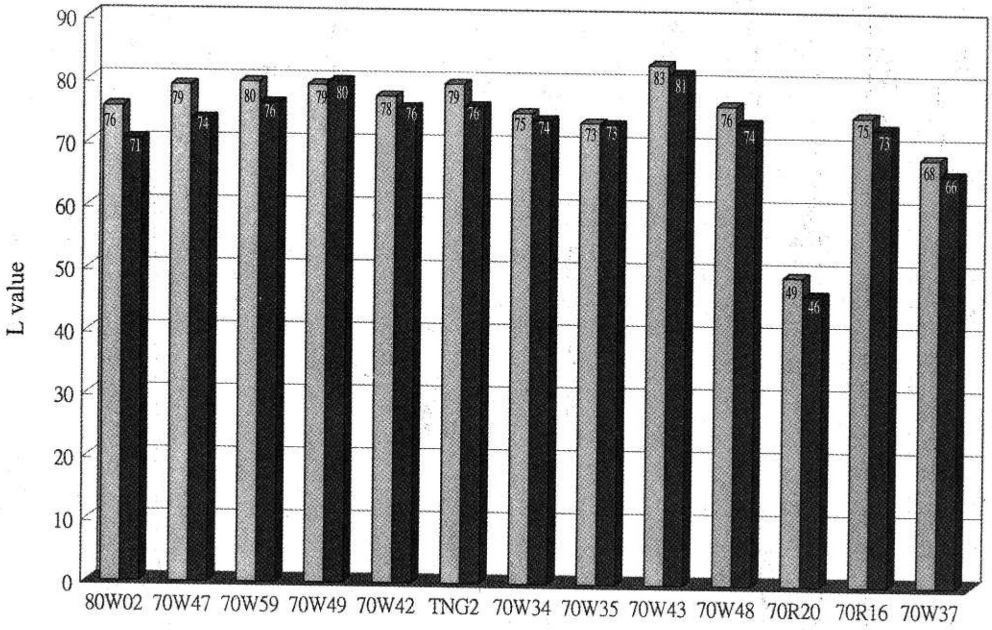


圖 7. 不同山藥塊莖肉部明亮度之比較。

Fig. 7. Comparison on flesh L value of various yams.

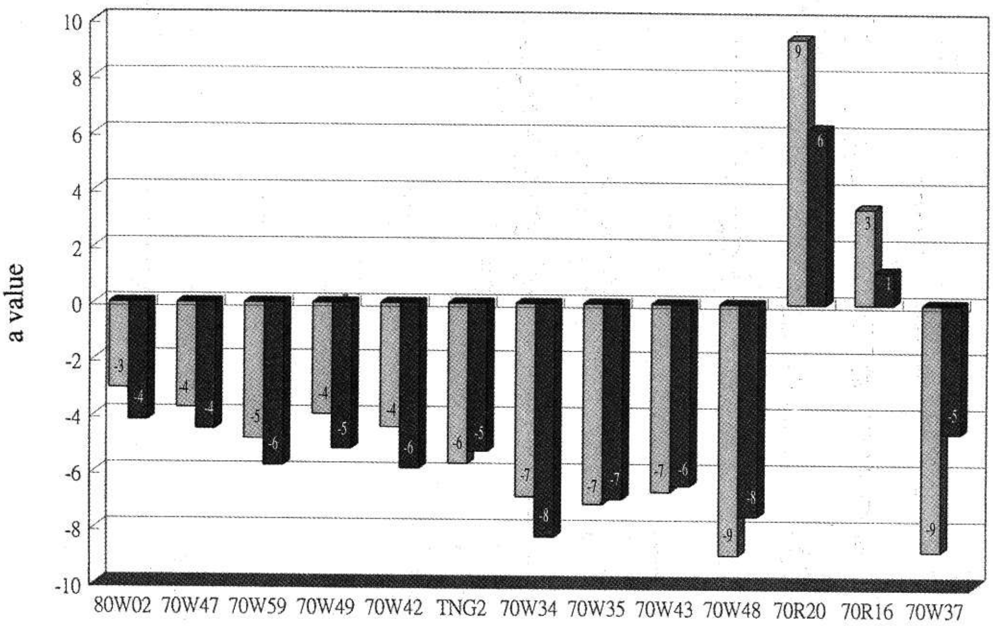


圖 8. 不同山藥塊莖肉部紅色度之比較。

Fig. 8. Comparison on flesh a value of various yams.

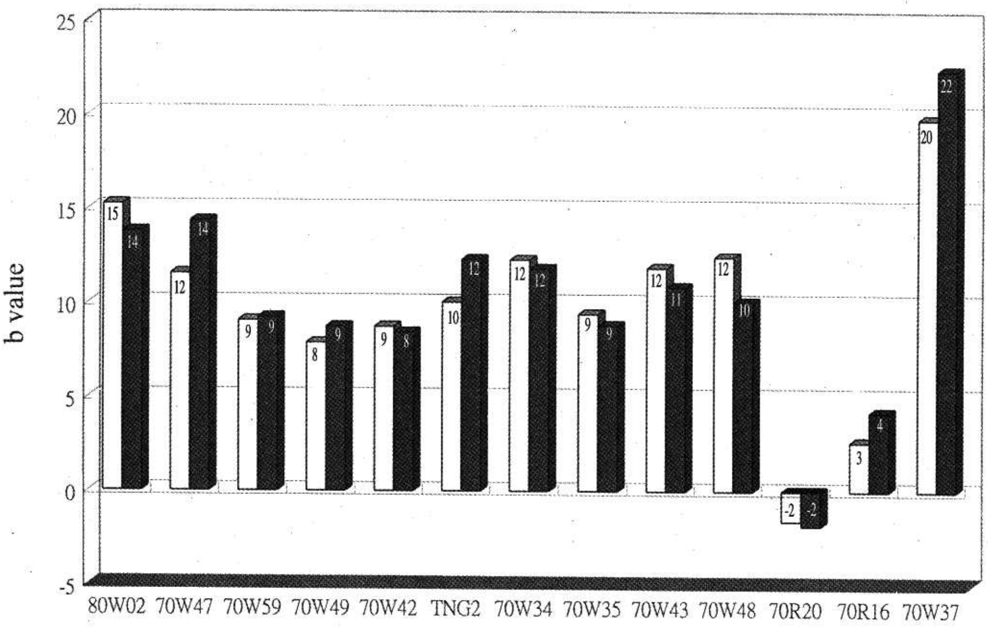


圖 9. 不同山藥塊莖肉部黃色度之比較。

Fig. 9. Comparison on flesh b value of various yams.

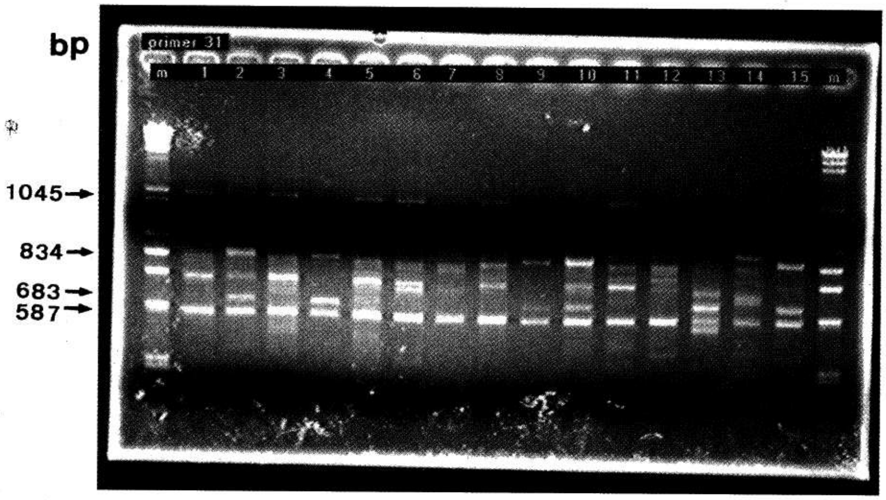


圖10.不同山藥品種系利用primer # 31及PCR技術分析之RAPD圖譜。圖譜上方橫標號碼表示不同山藥品種系，依試驗材料所示。

Fig.10. RAPD profile of *Dioscorea* spp. generated by primer # 31. Numbers on the top refer to the respective *Dioscorea* materials as indicated in material.

表5. 不同山藥品種系利用primer # 31進行RAPD分析之條帶數與分子量比較

Table5. Comparison on band number and position of RAPD profile of different *Dioscorea spp.* generated by using primer # 31

No.	Var. & lines	Band No.	Band position
1	青森A品系	5	603,834,1045,1154,2311
2	大淮A品系	5	587,683,8341045,1154
3	青森B品系	5	603,744,834,1045,2311
4	大淮B品系	4	587,683,834,1045
5	屏地品系	7	472,587,683,834,1004,1154,2311
6	基隆A品系	7	587,774,834,956,1045,1123,2311
7	基隆B品系	5	587,774,956,1004,1123
8	法山品系	5	587834,1045,1154,2311
9	中國長品系	4	166,587,683,1045
10	二刺品系	6	587,683,774,834,1045,1.85E+4
11	台農2號	8	347,440,587,834,903,1045,1154,2311
12	大蜜品系	5	392,587,903,1045,1154
13	黃藥品系	5	556,603,683,802,1004
14	大汕品系	7	424,603,774,903,1045,1154,1357
15	青島品系	4	587,683,834,1045

表6. 利用primer # 31進行山藥RAPD分析之電泳條帶分子量(bp)與強度之比較

Table 6. Comparison on band molecular weight(bp)and strength degree of RAPD profile obtained from different varieties and lines of *Dioscorea* spp. generated by primer # 31

No. / bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Present rate%
166									25							6.7
347											7					6.7
392												11				6.7
424													9			6.7
440											7					6.7
472					8											6.7
556													22			6.7
587		46		26	26	32	47	39	27	31	36	52			23	73.3
603	30		29										6	28		26.7
683		17		26	9				30	11			27		31	46.7
744			10													6.7
774						14	21			8				30		26.7
802													23			6.7
834	51	19	48	40	38	16		29		12	19				13	66.7
903											7	13		11		20.0
956						17	21									13.3
1004					8		8						24			20.0
1045	8	14	7	8		7		16	18	23	12	17		11	33	80.0
1123						3	3									13.3
1154	4	4			3			5			3	7		8		46.7
1357														3		6.7
2311	7		7		8	12		10			9					40.0
18500										14						6.7

(四)山藥嫩芽之急性毒性測試

山藥台農2號爲目前山藥之推廣品種之一，於1999年已推廣至21鄉鎮。取其嫩芽製備煎液，並以最高限劑量(5,000mg/kg)強迫餵食白鼠，不會造成白鼠死亡(表7)。處理後第7及14天，參試雌雄鼠之平均體重與平均增重百分率均出現明顯變化(表8、表9)，對照組雄與雌鼠之平均增重百分率依次如下：第7天約爲10.1%與3.4%，第14天約爲20.8%與9.1%；5,000mg/kg處理組雄與雌鼠之平均增重百分率，依次約爲第7天之12.8%與9.6%，及第14天之17.1%與14.5%(表9)。除了第14天雄鼠處理組之體重略遜於對照組外(表8)，其餘各5,000 mg/kg處理組之平均體重於處理後第7及14天均較對照組顯著增加(表8)，增重百分率亦同(表9)。以台農2號山藥嫩芽之最高限劑量5,000 mg/kg 強迫餵食白鼠，處理組鼠隻均不產生任何臨床症狀(表10)，大體解剖各器官亦無明顯肉眼病變現象。

表7. 強迫餵食台農2號山藥嫩芽造成白鼠死亡之分佈數之比較

Table7. Comparison on the death distribution of rats treated with young shoots of yam TNG2

Sex type	Days after treatment and death number of rats									Total death
	0	1	2	3	4	5	6	7	14	No.
Male	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表8. 強迫餵食台農2號山藥嫩芽對白鼠平均體重之影響

Table 8. Changes in body weight of rats treated with young shoots of yam TNG2

Sex type	Concentration (mg/kg)	Body weight(g)		
		0 day	7 days	14 days
Male	0	176.0± 7.4 a[z]	193.4±9.7 a	212.0±16.8 a
	5,000	177.2±14.7 a	199.8±15.8 b	207.6±20.2 b
Female	0	170.0± 9.3 a	175.8±18.4 a	185.4±22.6 a
	5,000	191.1±14.2 b	208.8±22.3 b	217.4±24.5 b

[z] Means followed by the same letter within the column of each rat sex type are not significantly different at 5% level by the F- test.

表9. 強迫餵食台農2號山藥嫩芽白鼠體重7天及14天增重百分率之變化比較

Table 9. Changes in increase rate(%)of rat body weight after 7 and 14 days of treatment with young shoots of yam TNG2

Sex type	Concentration (mg/kg)	Body weight increase rate(%)	
		7 days	14 days
Male	0	10.1± 7.7 a[z]	20.8±13.5 a
	5,000	12.8± 6.8 b	17.1± 5.8 b
Female	0	3.4± 8.8 a	9.1±12.0 a
	5,000	9.6± 13.4 b	14.5±18.0 b

[z] Means followed by the same letter within the column of each rat sex type are not significantly different at 5% level by the F- test.

表10.以台農2號山藥嫩芽進行白鼠口服急毒性處理14天內之臨床症狀觀察

Table 10. Maximum symptoms of rats observed within 14 days after being treated with young shoots of yam TNG2

Symptoms	Dose(mg/kg)			
	0		5,000	
	Female	Male	Female	Male
昏眩	0	0	0	0
過度敏感	0	0	0	0
間歇抽搐	0	0	0	0
遲鈍	0	0	0	0
後弓反張	0	0	0	0
俯臥	0	0	0	0
側臥	0	0	0	0
活動增加	0	0	0	0
活動減少	0	0	0	0
疲軟	0	0	0	0
僵直	0	0	0	0
抽搐	0	0	0	0
運動失調	0	0	0	0
麻痺	0	0	0	0
痙攣	0	0	0	0
突眼	0	0	0	0
淚眼	0	0	0	0
瞳孔放大	0	0	0	0
瞳孔縮小	0	0	0	0
眼皮下垂	0	0	0	0
流涎	0	0	0	0
皮毛粗剛	0	0	0	0
豎毛	0	0	0	0
呼吸急迫	0	0	0	0
呼吸困難	0	0	0	0
咳血	0	0	0	0
發紺	0	0	0	0
肺水泡音	0	0	0	0
鼻分泌物	0	0	0	0
下痢	0	0	0	0
排尿失禁	0	0	0	0

討論

山藥在歷代本草中都被視爲補虛佳品，「神農本草經」等本草典籍謂其性平、涼潤、味甘而無毒，能健脾胃、補肺腎及收澀固精，主治泄瀉久痢、消渴、虛勞、咳嗽、遺精、帶下及小便頻仍等[5,7,10]，另具袪痰功效；民間用爲滋養強壯藥[25]，古代名方如六味丸、八味丸、參苓白朮散、無比山藥丸、大山蕷丸以及坊間之四神湯中即有山藥。根據「醫學衷中參西錄」，利用山藥組配的方劑多達47方；根據歷代醫藥名方所載，利用山藥組配的方劑共達333方。清末民初的河北名醫張錫純，不僅稱讚山藥能滋潤血脈，固攝氣化，寧咳定喘，強志育神，性平可以常服多服，而且指出宜用生者煮汁飲之，不可炒用，以其含蛋白質甚多，炒之則蛋白質焦枯，服之無效。

由現代研究報告發現，山藥含有皀苷、粘液質、膽鹼、澱粉、糖蛋白、鞣質、多種胺基酸、維生素C及鈣、磷、鐵等[27]，具有增強機體的免疫功能[18]，改善冠狀動脈及微循環的血流，有鎮咳、袪

痰、平喘等藥理作用；山藥皀苷(diosgenin)是激素的原料之一，其藥用價值似具有科學根據。臨床實驗另外證實，山藥確有增進食慾、改善人體消化功能及增強體質等多種功能。近來還發現山藥和黃耆、黨參、何首烏、巴戟天、靈芝、人參等生藥相似，有誘生干擾素的作用。

台灣之氣候土質很適宜山藥生長，栽培管理簡單，且病蟲害不多；以往產量不高之因，與未能慎選品種、未能建立穴管栽培技術及未能開發多元化加工產品有關[1,2,21,22]。就本研究13種山藥品種系而言，若能選擇高產優質之品種如山藥台農2號(產量高達45.6t/ha)、大葉壽豐品系(產量達43.8t/ha)、二刺品系(產量達41.6t/ha)、大汕三品系(產量38.3t/ha)或中國長品系(產量34.0t/ha)等，且管理得宜，並能開發多元化加工產品，則塊莖收量將不至太差，可因此提高農民不少收益(圖 1)。

在本研究13種參試山藥品種系中，除了名間長紅與紫玉血薯兩品系之塊莖肉質爲紅色外，其餘11種皆屬白色。在塊莖長度方面一般雖分成三類：如中國長品系、二刺品系、大淮品系、青森品系、大葉壽豐品系、基隆品系及北投品系等7種應爲長形(長度>50cm)；台農2號品系、大汕二品系、大汕三品系、名間長紅品系與紫玉血薯品系等5種應爲中形(20cm<長度<50cm)；黃藥品系則爲短形(長度<20cm)(表 1)，惟由表 2之結果可知，實際生產之塊莖長度除受品種特性影響外，栽培地區之氣候土質及田間管理等因素確有很大之影響。

礦物質是維繫人體內各種生理代謝運作正常之重要無機物質[34]，如P與細胞之成長與修護，以及腎功能有關；K能調節體液之pH值，影響神經傳導及心肌活動；Ca促進骨骼及牙齒發育，與肌肉收縮及神經傳導有關；Mg影響碳水化合物之代謝，與高能鍵之轉換有關；Fe增進氧氣運送，且與酵素活性有關；Mn與某些酵素之活性有關；Cu與血紅素之產生有關；Zn與一些酵素之活性有關，又是胰島素之成分之一。綜論本研究表4a及表4b之分析比較結果可知，青森品系含有頗高量之P、K、Ca、Mg、Fe、Mn、Cu、Zn，而在Cd、Cr、Ni、Pb之含量則不高；黃藥品系含最高量之Fe、Mn、Cd、Cr及Ni，其Fe之含量比其他參試植物高出約7～70倍，Mn之含量約高出1.5～60倍。惟根據「中藥大辭典」轉載「南方主要有毒植物」[4]一書可知，誤吃黃藥可引致口、舌、喉等處燒灼痛，及流涎、噁心、嘔吐、腹痛、腹瀉、瞳孔縮小等，嚴重時出現昏迷、呼吸困難、心臟麻痺或死亡等；且有部分地區之民眾誤用黃藥之塊莖爲何首烏，消費者在取用黃藥時，不可不慎，能遵照醫生指示再使用更佳。

聯合國國際農糧組織與世界衛生組織(FAO/WHO) 於1973年制訂了人體對毒物每日可接受取食量(Acceptable daily intake, 簡稱ADI)之安全規則，其內含爲根據目前所得的安全資訊，在整個生命過程中，人體每日接受低於一定劑量之某種化學物質，不致因而會受到毒害，其單位爲每公斤體重可攝取之微克數(μ g/kg b. w. / day)[13]。例如成人每天銅的攝取量不可多於2mg、鋅爲15mg[8,9]、鎘爲48-60 μ g、鉛爲357.5 μ g[12]。在本研究13種山藥植物中，鋅、鎘、鉛最高含量依次爲 26.2, 0.2及0.8 μ g，相對應之每日可接受取食量(ADI)標準依次爲12,500,48-60,357ug,其攝食量仍應留意，不可過量(表4a及4b)。

過氧化酵素(peroxidase, PO, EC 1.11.1.7)，爲一含鐵之蛋白質，參與氧化還原等催化反應，其電子接受者爲H_2O_2，而電子的供應者爲許多物質之基本成分，如phenolic compound、aromatic amines、ascorbic acid等，亦有報告指出其與catalase, IAA-oxidase, polyphenol oxidase等有關[17]。多酚氧化酵素(polyphenol oxidase, PPO, EC 1.10.3.1)亦稱tyrosinase, cresolase, catechol oxidase,或DOPA oxidase，爲一含銅之酵素，亦參與氧化還原反應，酚類化合物爲其主要受質[3,17]。多酚氧化酵素於植物體中具有重要之生理功能，與植物之防衛系統、傷口癒合及老化等有密切關係[26,32,37]。總酚類化合物(total phenolic compound, TPC)包括monocyclic phenol, dicyclic phenol, polycyclic phenol，以許多種形態存在於自然界中，與果實之顏色、香味、質地及褐變等有很大關係。本研究所述不同山藥之L、a、b值變化，PO及PPO酵素活性以及TPC化合物含量之差異，或多或少皆與山藥或其他天然物之自我防衛系統及抗氧化

特性有關[6,14,29]，其表現程度則依品種別而異(圖4~圖9)。

由於合成之抗氧化劑在安全上出現了問題，所以天然抗氧化劑的需求正日益殷切，近年來許多研究嘗試自天然物中分離純化抗氧化物質，已有具體分析結果的有：大豆的異黃酮素，芝麻的lignan衍生物，茶葉的兒茶素及茶黃素，野生日本葡萄及茄子的花青素，迷迭香及鼠尾草中的carnosol 衍生物，薑的gingerol ，辣椒的capsaicin 衍生物，鬱金的curcumin衍生物，百里香的類黃酮素，銀杏葉的ginkgolide,蜂膠的類黃酮素，米糠的oryzanol，花生殼的luteolin ，稻穀的isovitexin，黃芩、陳皮、營實、十藥(魚腥草)、葛根、桑白皮等的類黃酮素，五倍子、訶子、石榴皮、芍藥、牡丹皮、山茱萸的單寧，紫蘇的咖啡酸衍生物，決明子的anthracenedione 衍生物，紫地丁的沒食子酸、黃烷酮及單寧等衍生物，羌活的phenethy ferulate，補骨脂的bakuchiol,草果的多酚化合物，翠玉茶梗的類黃酮素，肉豆蔻的丁香酚衍生物及雙聚物，鳳凰花的類黃酮素及沒食子酸十七酸酯等。本研究僅就13種山藥植物之部分抗氧化酵素與抗氧化物質進行初步比較，後續之研究將蒐集更多山藥品種，及進行其他相關抗氧化酵素與抗氧化物質之解析、比較及評估，俾供篩選具抗氧化效用山藥品種之參考。

本研究另針對山藥芽之安全性進行評估，以台農2號*(Dioscorea alata)*山藥嫩芽煎液最高限劑量5,000mg/kg進行強迫餵食[28]白鼠，處理後第14天雌雄鼠之平均體重均顯著增重(表8及表9)，且均不產生任何臨床症狀，各器官亦無明顯的肉眼病變或死亡現象(表10)，顯示一次服食極高劑量山藥芽葉之煎液，不致造成白鼠急性毒性現象。由於LD_{50}之劑量大於5,000mg/kg，依據Gleason等人之毒性分類可知，台農2號山藥芽可歸類屬於無毒類或低毒性類。

誌 謝

本研究承蒙行政院國家科學委員會補助計畫經費(計畫名稱：88年度藥用及保健植物-抗氧化山藥品種之引進、篩選、栽培與利用研究，計畫編號：NSC88-2317-B-055-002)，試驗進行期間得蒙本所張隆武、黃文玲、郭朝水、陳盛彰、白耀聰等先生、陳冠燕、賴明秀、莊淑荃、葉麗娟與張清惠等小姐之協助，謹致衷心謝意。

引用文獻

1. 山藥促銷與編輯小組。1993。山藥之利用與栽培。農業試驗所及花蓮區農業改良場編印。台中縣及花蓮縣。
2. 王昭月、賴永昌、譚增偉、劉新裕。1992。山藥之生產促進及省工栽培研究。中華農業研究 41：43-52。
3. 王俐婷、宋賢一、張珍田。1999。基隆山藥塊莖多酚氧化酵素之純化及性質研究。中國農業化學會誌141-151。
4. 中藥大辭典編輯委員會。1981。黃藥子。中藥大辭典。昭人出版社。台中市。
5. 行政院衛生署中藥典範編輯委員會。1985。山藥・中華民國中藥典範第一輯。台北市。pp：577-579及660-664。
6. 王俐婷、宋賢一、張珍田。1998。基隆山藥塊莖採收後之生化學研究。中國農業化學會誌 36：547-554。
7. 那 琦、甘偉松、楊榮季。1978。台灣產藥材之生藥學研究(IV)台灣產零餘子之生藥學研究。中國醫藥學院研究年報 9：330-375。
8. 李豔琪、王銀波。1997。銅污染土壤與作物生長關係之研究。中華農學會報 新181：48-58。
9. 李銘全、盧虎生、朱鈞。1998。 重金屬銅對植物之影響。科學農業 46： 353-360。
10. 林俊清。1986。山藥。新編生藥學(第I集)。高雄醫學院出版。高雄市。pp：116-123。
11. 林俊清。1995。應用生藥學(I)生藥與自由基。富山出版社。高雄市。
12. 林浩潭、翁愫慎、李國欽。1992。作物中重金屬含量調查及我國國民對重金屬取食量之探討。中華農業化學會誌 30：463-470。
13. 胡漢升。1989。環境醫學。科技圖書股份有限公司。pp.55-68。
14. 吳聲舜。1998。遮蔭處理與加工方法對綠粉茶品質之影響。國立中興大學碩士論文。
15. 進益。1988。山藥。經濟植物集。豐年社出版。pp：44-49。

16. 簡旭祺。1998。山藥切片在貯藏期間色澤與質地變化之研究。國立台灣大學碩士論文。
17. 黃文玲。1997。楊桃果實褐化潛勢與多酚氧化酵素活性、過氧化酵素活性、酚類化合物濃度及可溶性蛋白質濃度之關係。國立中興大學碩士論文。
18. 劉鴻珠。1998。中藥免疫增強性低分子物質之初步篩選。藥草。台北市。
19. 劉棠瑞、黃增泉。1962。台灣之薯蕷屬植物。Bot. Bull. Acad. Sini. 第三卷。台北市。
20. 劉棠瑞、黃增泉。1978。Dioscoreaceae薯蕷科。Flora of Taiwan。pp：100-109。
21. 劉新裕。1989。千里達山藥之生產能力與品質分析研究。中華農業研究 38：312-325。
22. 劉新裕、呂秀英、王昭月、賴永昌。1990。環境因子對山藥生長與產量之影響。中華農業研究 39：287-296。
23. 劉新裕、王昭月、徐原田、段中漢。1992。山藥台農 1號之育成。中華農業研究 41：140-158。
24. 劉新裕、王昭月、徐原田、胡敏夫、楊宏仁、何琦琛。1996。山藥台農 2號之育成。中華農業研究 45：260-284。
25. 謝麗珊。1998。中草藥對前列腺素15-氫氧基去氫的影響。藥草。台北市。
26. Bouthyette, P.Y., N. Eannetta, K.J. Hannigan and P. Gregory. 1987. *Solanum berthaultii* trichomes contain unique polyphenol oxidase and peroxidase. Phytochemistry 26:2949-2954.
27. Bradbury, J. H. and W. D. Holloway. 1988. Chemistry of Tropical Root Crops. Australian Centre for International Agricultural Research. Canberra. pp:27-98.
28. Chan, P.K. and A.W. Hayes. 1994. Acute toxicity and eye irritancy. In Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. Raven Press. New York. pp.579-648.
29. Cheng, G.W. and C.H. Crisosto. 1995. Browning potential, phenolic composition, and polyphenoloxidase activity of buffer extracts of peach and nectarine skin tissue. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 120:835-838.
30. Environmental Protection Agency Office of Pesticides & Toxic Substances. 1982. Acute oral toxicity. In Pesticide Assessment Guidelines. Subdivision F. Hazard Evaluation: Human and Domestic Animals. 81-1, pp. 39-43, Washington, DC.
31. Farm Chemicals Handbook. 1986. Meister Publishing Co., Willoughby, OH.
32. Ikediobi, C.O., R.L. Chelvarajan and A.I. Ukoha. 1989. Biochemical aspects of wound healing in yams(*Dioscorea* spp.). J. Sci. Food Agr. 48:131-139.
33. Larson, R.A. 1988. The antioxidants of higher plants. Phytochemistry 27:969-978.
34. Mertz, W. 1981. The essential trace elements. Science 213：1332-1338。
35. Onwueme, I.C.1978. Origin, classification, and growth cycle of the yam plant.The Tropical Tuber Crops. Pitman Press, New York. pp:3-16.
36. Tindall, H. D. 1983. Dioscoreaceae. Vegetable in the Tropics. Macmillan Press London. pp：201-224.
37. Tremolieres, M. and J.G. Breth. 1984. Isolation and characterization of the polyphenol oxidase from senescent leaf of black poplar. Phytochemistry 23:501-505.
38. Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrarily primer. Nucleic Acids Res. 18：7213-7218。
39. Yamaguchi, M. 1983. Yam. World Vegetable. AVI publishing company. U. S. A. pp：139-147.

Studies on the Varietal Characters, Production Potential, Phytochemical Properties, and Antioxidant Effect of *Dioscorea* spp.[1]

Sin-Yie Liu, Torng-Wu Chang, Yi-Kung Lin, Su-Feng Chen[2], Jau-Yueh Wang[3], Gean-Liang Zu[4], and Shun-Cheng Wang[5]

Summary

A total of 13 *Dioscorea* genotypes had been cultivated, analyzed, and evaluated at Taiwan Agricultural Research Institute(TARI). The results obtained from comparison test on the varietal characters, yield potential, and phytochemical properties of these *Dioscorea* plants indicated that TNG2, 70W42, 70W47, 70W35, and 80W02 might be the most promising lines due to their high yield potential over 34 t/ha, among them 70W35 and 70W42 had a higher peroxidase activity than others. Yam line 70W49 possessed more mineral elements and also a higher peroxidase activity, but a lowest yield of 8 t/ha. The acute toxicological effects of water crude extracts of TNG2 buds administered in single dose of 5,000mg/kg(maximal test threshold) were also evaluated. No gross abnormalities were noted in any organs of the treated animals at the necropsy. The TNG2 buds belonged to one of non- or less-toxic products.

In order to assess and distinguish the genetic diversity of all the *Dioscorea* species used in this experiment at DNA level, the *Dioscorea* samples were detected by RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique.Total 23 polymorphic DNA fragments were scored for all materials tested using primer #31 : 5' TGTCCGGGTG3', a random 10 bp primer selected from 35 primers used in TARI. Among these fragments, 11 fragments existed only in each of *Dioscorea* samples. 587 bp didn't exist in 70W49, 70W37, and 70W33. 956 bp and 1,123 bp existed only in 70W43, and 556 bp and 802 bp only in 70W37 . These fragments could be used as useful markers for distinguishing the genetic diversity of all the yam species used in this experiments.

Key words : *Dioscorea* spp., Varietal character, Production, RADP, Antioxidant effect, and Acute toxicity.

---

1. Contribution No. 1996 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.
2. Respectively, Senior Agronomist, Assistant, Research Assistant, and Project Assistant, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan, ROC.
3. Research Assistant, Office of Plant Germplasm, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
4. Assistant, Department of Agricultural Chemistry, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
5. Vice Director of Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic Substances Research Institute. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 23～31 (1999)

苦瓜果實構造及發育之研究

I.苦瓜果實構造與受精過程[1]

張有明 劉邦基 蕭吉雄[2] 許圳塗[3]

摘要：本文探討苦瓜果實構造與受精過程。苦瓜之雌花為子房下位，側膜胎座，胚珠倒生。子房三室，具分離的橫隔，子房內壁和子房室間亦分離呈中空，與橫隔及胚珠間有管道相通；每一子房室中二排胚珠共14-18粒，呈直立或下垂排列者，分佈常不在同一水平面；子房室之間的胚珠也呈不規則的交互排列，同一橫切面最多出現四粒排列不整的胚珠，和其他瓜類不同。一子房內胚珠平均在40粒左右，最高可達60粒以上。雌蕊為濕式柱頭三裂，呈"U"型排列於花柱上；花柱為開放型(中空的)。當授粉後1小時，發芽的花粉管已進入柱頭的乳頭狀組織內；三至四小時後，由三裂柱頭而來之三叢花粉管束，將會合於花柱中；約6小時後通過花柱進入子房腔；12小時已有受精作用產生；18~24小時將完成受精作用。在子房內，花粉管數隨著時間及花粉管的延伸而迅速遞減；在近子房基部區，已很難找到花粉管。在人工的花粉發芽培養基中，花粉經發芽1小時後，可觀察到生殖核已由花粉粒進入花粉管中。雌花於開花前兩天下午(傍晚)到開花後一天下午(傍晚)均具有受精、結實(種子) 能力，惟著果率、結實率均偏低，調查結果顯示，以開花前一天下午到開花當天下午的授粉結實率為佳。

關鍵詞：苦瓜、果實構造、花粉管、受精作用。

前　言

苦瓜(*Momordica charantia* L.)屬葫蘆科(Cucurbitaceae)作物，因果實含有具特殊苦味的醣苷(momordicosides)，故名[3,9,10]。為一年生蔓性草本植物，性喜高溫，在台灣一年四季均可栽培[4,7]。近年來由於品種的改良，栽培技術的改進，使得栽培面積急遽增加，已達2600公頃左右，是本省重要的夏季果菜之一[8]。

瓜類大都由三個心皮(carpel)所組成，三花柱相連合併為一圓柱形花柱，花柱的結構主要分為閉合型(實心的)和開放型(中空的)兩種。開放型在結構上，通道周圍常有一層特殊的內表皮細胞，稱通道細胞(canal cell)，專供花粉管延伸；柱頭三裂，依授粉時柱頭會產生分泌物之有無，分為濕式和乾式兩種[5,19]。瓜類屬子房下位，內有三子房室；子房內部構造，每一子房室之間形成三條明顯的橫隔(septum)，有實心(如西瓜、胡瓜和冬瓜)和分離[中空，如美國南瓜(*Cucurbita pepo*)]之分[2,6,15]；當心皮接近子房內壁時轉向內朝子房的中心，每一心皮內轉的邊緣形成胎座，著生胚珠[5]。苦瓜方面，僅

1.行政院農業委員會 農業試驗所 研究報告第 1997 號。

2.本所園藝系助理研究員、副研究員、研究員兼系主任。臺灣省 台中縣 霧峰鄉。

3.國立臺灣大學園藝研究所教授。台北市。

Deshpande 等人[13,14]和van Rensburg等人[22]對苦瓜及其相關種的小孢子發育，及Singh和Dathan[21]對胚珠的排列等有零星的報導；而有關苦瓜之雌花構造、授粉後之花粉管延伸與受精、受精後之果實與種子發育等方面仍無較詳盡資料可供參考。因此本試驗將針對本省兩個栽培種苦瓜，進行雌花和幼果的解剖，並調查其形態構造，以瞭解授粉後，花粉管延伸及到達胚珠的時間和過程；另進行不同發育時期的雌花，授以新鮮花粉，對果實和種子發育的影響。這些將有助於我們對於苦瓜果實的構造與發育的瞭解，可提供苦瓜栽培、組織培養、基因轉殖及育種等研究人員的參考。

材料和方法

本試驗的材料爲農友二號(Known-You No. 2,簡稱NY)和月華(Moon Shine,簡稱YH)兩個栽培種苦瓜。將種子播種於溫室，育苗至三、五片本葉大小，定植田間培育至開花時，開始採集花粉、授粉及採收不同授粉期的果實，進行下列各種調查及試驗分析：

一、**雌花構造與解剖形態觀察**：於盛花期採集雄花、雌花及授粉後之幼果，於解剖顯微鏡及光學顯微鏡下進行各種外形、橫切面及縱切面的染色、觀察及統計。

二、**雌花接受花粉能力調查**：分別以開花前二天、前一天、當天、開花後一天及開花後二天的雌花，進行上午(8：00～9：00)和下午(4：00～5：00)的授粉，每一處理20餘朵。上午授粉用的花粉，採用當天上午開花的花粉；下午授粉用的花粉，是將授粉當天會開的雄花採下先保存在4℃下，於下午授粉前置室溫一小時後取用。於授粉五天後採收，調查及統計著果情形。

三、**授粉後花粉管的伸長調查**：採用花粉管螢光染色法，參考Kho和Baer[18]並稍作修改。開花前一天先行雌、雄花的套袋，於開花當天上午同時授粉，並分別於授粉後1、6、12、18、24小時，採收雌花(果實)置F.A.A.溶液(含10ml福馬林、10ml冰醋酸、80ml 95％酒精)中固定4小時以上，以1N NaOH在60℃恒溫下軟化30～60分鍾，清洗去鹼液後，換上 0.1％ aniline blue 染劑(溶於0.1N K3PO4)，隔天即可進行花粉管螢光顯微鏡觀察。

四、**發芽花粉管的核分佈觀察**：取當天上午開的苦瓜雄花，刮取新鮮花粉置30℃的花粉發芽液中，發芽一小時以後，吸除花粉發芽液並加入數滴Feulgen染劑[16]，染色10～15分鍾直接壓片，置光學顯微鏡下觀察，記錄花粉管的延伸與核的分佈。

結　　果

一、雌花構造與解剖形態觀察

苦瓜雌花的花柱是由三個不分離的心皮上部所形成，其上再分裂成三個很明顯的柱頭，每個柱頭呈”U”字型排列；苦瓜爲濕式型柱頭，上面佈滿疏鬆高低起伏的乳頭狀組織(papillae)(圖1-A)。柱頭內部由葉肉細胞所構成，外圍細胞含有綠色的葉綠體，並有類似花粉管通道(pollen tube canal, PTC)的特殊孔洞供花粉管進入(圖1-B)。花柱的結構屬開放型(中空, hollow)，中間有中空的花粉管通道，其四周圍由特殊通道細胞(canal cell)構成，花柱基部旁的萼片附著五個黃色的退化雄蕊(staminodia, St)，往往兩個兩個排在一起(圖1-C）。子房由三個心皮(carpel)組成三個子房室(locule)，每一子房之間的橫隔(septum)是分離的，屬中空的結構(圖1-D)；而子房內壁與子房室之間亦是分離呈中空狀態(圖1-E)，且與橫隔相互連接成花粉管路徑(pollen tube pathway），此點可由圖1-D紅色圖像得到證實，當紅色墨汁滴於果實橫切面的中央後，紅色墨汁很快擴散開來並流到子房內壁與子房室之間，此通道也可以和胚珠的假外珠被(假種皮)相連接(圖1-F)。假外珠被將來發育成爲苦瓜成熟果實中，唯一不具苦

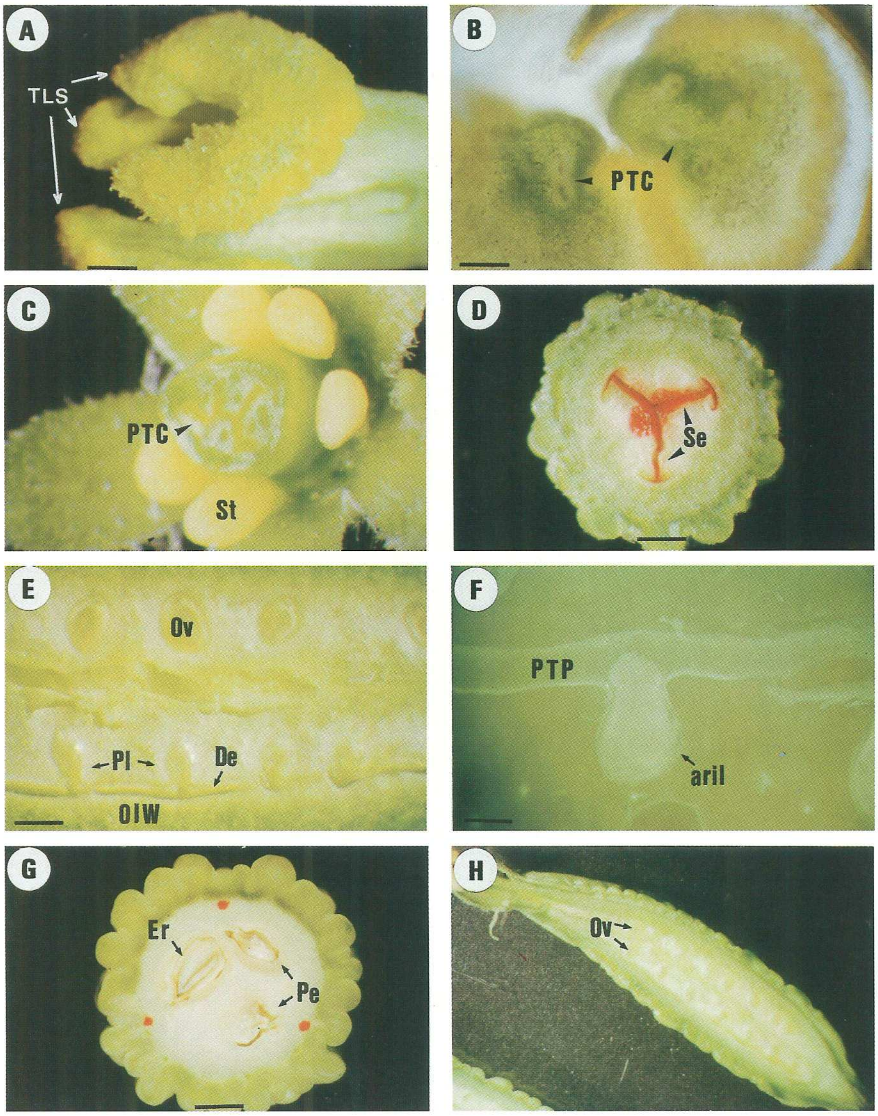


圖1. 苦瓜雌花和果實的形態構造A, 柱頭三裂；B, 柱頭組織及花粉管通道組織；C, 花柱中的花粉管通道和退化雄蕊；D, 子房三室和開裂的橫隔(染紅色部份)；E, 子房室的胎座位置和子房內壁之間開裂及倒生排列不整齊的胚珠；F, 包裹胚珠的假種皮和花粉管的路徑相通連；G, 直立或下垂的未成熟種子；H, 正常的雌花一列胚珠有7~9粒。

Fig 1. Female flower and fruit anatomy of bitter gourds A, Three-lobed stigma (TLS) on a columnar style. (bar = 1.6 mm); B, Stigmatic cell and pollen tube canals (PTC). (bar =0.4 mm); C, Pollen tube canal (PTC) in the style and staminodia(St). (bar =0.63 mm); D, Tricarpellate ovary and septum (Se) structure (red area). (bar=1.5 mm); E, Dehiscence (De) between basic area of placenta (Pl) and ovary inner wall (OIW), and anatropus ovules (Ov) of irregular arrangement. (bar =1.0 mm); F, Aril of covered ovule connected with pollen tube pathway (PTP). (bar =0.81 mm); G, Erect (Er) and pendulous (Pe) immature seeds. (bar =1.25 cm); H, Seven to nine ovules (Ov) per row in a female flower. (bar =5 mm).

味反而具有甜味、外表呈現朱紅色、質地鬆軟的假種皮。和一般瓜類一樣苦瓜雌花果實爲子房下位(inferior ovary)，也是屬側膜胎座(parietal placenta)，胚珠倒生(anatropous)附著其上(圖1-E)。胚珠著生較特別而不同於其它瓜類的是，苦瓜三室，每一室著生兩排胚珠，六排胚珠之間呈不規則的交互排列著，在同一水平面上最多出現四排胚珠；胚珠著生有直立(erect)或斜垂(pendulous)(圖1-G)；同一室內二排也常交互排列，正常果每排約7~9粒(圖1-H)，而最多紀錄爲一排有11粒。所以正常果每一子房含有的胚珠數平均在40粒以上，據調查最高者一果內可達60粒左右(資料尚未發表)。苦瓜生育初期開的早生花或生育後期的晚生花，不僅果實較短小且每排胚珠約僅4~7粒。

二、不同發育期的雌花，其授粉後的果實肥大情形

爲瞭解不同發育期的雌花接受花粉的能力，分別以開花前一、二天、當天及開花後一、二天的雌花，進行上午(8：00～9：00)和下午(4：00～5：00)的授粉試驗。由表1的結果顯示，苦瓜雌花在開花前兩天上午授粉仍無著果能力(無膨大果)，在下午授以新鮮花粉(預先冷藏處理)則少部份會著果，但受精不完全，果實膨大者均呈畸形果；畸形果內部僅少數種子可繼續發育膨大，亦有內部種子已全部萎縮停止發育。開花前一天授粉，其著果力已顯著增加達70~80%以上，也有發育正常的果實產生；而下午授以新鮮花粉，其正常果比例更高達50%以上。開花當天授粉的著果率已近百分之百，除部份受精不完全外，大多數果實均能正常肥大；但下午授粉的正常果比例則較上午授粉者略低。開花後一天上、下午授粉仍可結果，但都是屬於受精不完全的畸形果，且整體的著果率已急速下降至25%以下。而開花後兩天，除了上午授粉有一果實膨大外，則已全無著果能力。經解剖此一果實，發現內部種子均已萎縮停止發育。另調查苦瓜雄花的花藥開裂情形，結果顯示在開花前一天晚上約十一點以後藥壁即陸續開裂(但此時花瓣尚未展開)，露出成熟的花粉。

表1 不同生育期的苦瓜雌花授粉後的果實膨大情形

Table 1. Development of fruit from pollination with different development of female flower

生育時期	授粉時期	總授粉數	不同發育的果實數及百分比(%)		
			無膨大	畸形膨大	正常膨大
開花前兩天	上午	21	20(95.2)	1 (4.8)	0
開花前兩天	下午	22	17(77.3)	5(22.7)	0
開花前一天	上午	22	3(13.6)	12(54.6)	7(31.8)
開花前一天	下午	21	6(28.6)	4(19.0)	11(52.4)
開花當天	上午	23	0	4(17.4)	19(82.6)
開花當天	下午	21	0	5(23.8)	16(76.2)
開花後一天	上午	22	17(77.3)	4(18.2)	1 (4.5)
開花後一天	下午	20	15(75.0)	4(20.0)	1 (5.0)
開花後兩天	上午	23	22(95.7)	1 (4.3)	0
開花後兩天	下午	17	17(100)	0	0

三、授粉後花粉管的伸長調查：

苦瓜授粉後1小時，其花粉已發芽並伸入乳頭狀組織(圖2-A)；由三柱頭而來的花粉管束在花柱中會合(圖2-B)通過花柱，據推算此時約在授粉後2-3小時左右；授粉後6小時花粉管已達花柱基部，部份

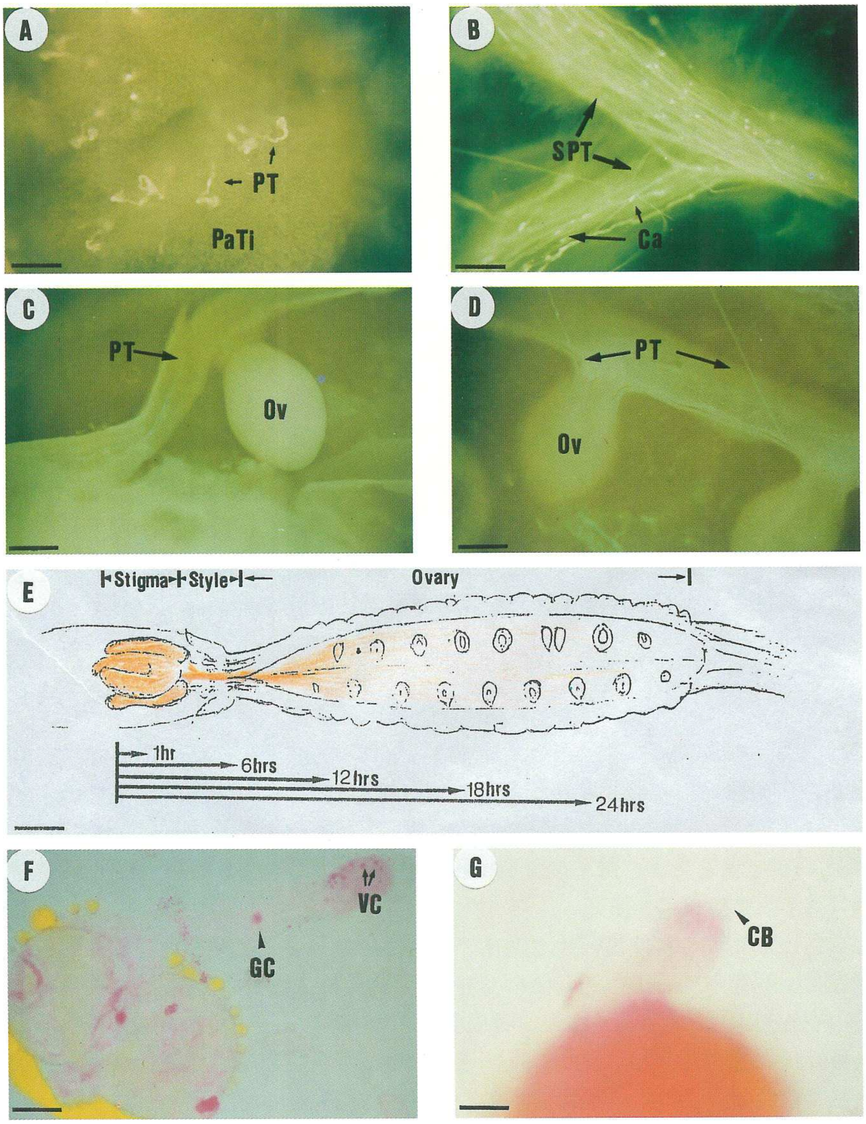


圖2. 苦瓜花粉發芽後花粉管的延伸和特性A, 花粉發芽後一小時進入柱頭情形；B, 來自三分裂柱頭的花粉管束匯流集中進入花柱和花粉管內的胼胝質；C,花粉管沿著花粉管的路徑前進；D, 花粉管進入胚珠；E, 黑色箭頭表示苦瓜授粉後1, 6, 12, 18和24小時的花粉管到達區域，橘紅色區表示花粉管的分佈範圍(顏色深淺則表示花粉管數的多寡)；F,花粉管上的生殖細胞和營養細胞；G, 花粉管尖端"帽區"管壁薄或不含花粉管壁。

Fig 2. Characteristics and elongation of pollen tubes after pollen germination of bitter gourd; A, Pollen tubes (PT) penetrated into papillae tissue (PaTi) at one hour after pollination. (bar =0.81 mm); B, Streams of pollen tubes (SPT) from three-lobed stigma coverage into style and calloses (Ca) in pollen tube. (bar =1.62 mm); C, Pollen tubes (PT) elongated via pollen tube pathway (PTP). (bar=1.62 mm); D, Pollen tubes (PT) penetrated into ovule (Ov). (bar =1.62 mm); E, Distribution (orange area, numbers of pollen tube according to degree of orange color increasingly) and elongation (arrows) of pollen tubes (PT) at 1,6,12,18 and 24 hrs after pollination. (bar =2.2 mm); F, Vegetative cells (VC) and generative cells (GC) in a pollen tube. (bar =50 um); G, " Cap block " (CB) on the tip area of pollen tube was with thin tube wall or without tube wall. (bar =12.5 um).

並已進入子房腔；授粉後12小時，生長快的花粉管已到達並超過子房前端(靠近柱頭端)的胚珠，其前進的路線都是沿著特殊而細密的組織所形成的花粉管路徑所引導(圖2-C)，此時也已有一些花粉管進入胚珠(圖2-D)；授粉18小時後，花粉管延伸都超過子房的一半而到達2/3處，但此時的花粉管數變得稀疏，已不到原有的十分之一；24小時後，可觀察到花粉管已延伸達基部(靠近果梗端)，唯到達子房基部的花粉管則是稀稀落落偶而祇見1~2條而已。圖2-E的橙色標示是在顯示授粉後，花粉管的延伸與分佈範圍，而顏色的濃淡深淺是在顯示花粉管量的多寡。苦瓜花粉管的胼胝質(callose)爲長方形到橢圓點狀(圖2-B)，據觀察各花粉管的胼胝質若在相同或接近的位置，常會使多條花粉管聚成一束的情形(圖2-B)，尤其是在延伸12小時後花粉管數很少時，偶而會有4~5條花粉管的胼胝質相黏在一起，再分散向各胚珠前進。

四、發芽花粉管的核分佈觀察：

將新鮮花粉置30℃的花粉發芽液中發芽一小時以後，用feulgen染劑染核，看核分佈情形，苦瓜的精細胞(生殖細胞)(generative cells, GC)約在花粉管延伸200～400 μm(約爲花粉直徑長的3～5倍)之後出現；此時觀察花粉管尖端亦有染色較深的點區應爲管核(營養細胞)(vegetative cells, VC)區(圖2-F)。將花粉管尖置高倍顯微鏡下，可看到不具花粉管壁或管壁極薄的帽區(cap block, CB)(圖2-G)。

討 論

經調查苦瓜爲子房三室，三花柱亦相連合併爲一，其上方柱頭也是明顯三裂和其它瓜類相同[2,15]，花柱中間有明顯裂縫應爲中空型的花粉管通道。花柱基部有明顯的3~5粒黃色小球體，此黃色小球體經顯微觀察，該球體外表細胞緊密、球體中空，雖不同於Van Rensburg等人[23]在苦瓜相關種*M. balsamina*所述的退化雄蕊是實心體，但此黃色小球體與萼片相連，依李[2]所述的位置也是著生退化雄蕊，因此研判該小球體應爲退化雄蕊。

苦瓜和其它瓜類比較，其差異較大之處在於子房的內部構造上---苦瓜雌花的三個子房室之間的橫隔明顯分離而且中空和南瓜一樣[2]，而與實心的西瓜、胡瓜和多瓜不同[6]。另外子房內壁和子房室的胎座之間也是中空的和南瓜[2]、冬瓜一樣，但與胡瓜不同[6]。而苦瓜在子房內壁和子房室之間不僅中空且和橫隔及包裹胚珠的假種皮間都是彼此相互連通，因而形成一完整的可供花粉管通行的網狀系統，這一特殊構造在其它瓜類[2,6,14]尙無這方面的報導，而種子具假種皮也是苦瓜所特有。

依據調查結果，苦瓜應爲濕式柱頭。當授粉時在柱頭上的乳頭狀組織會分泌物質與花粉表面組織辨認後，花粉很快發芽；授粉後1小時發芽的花粉管就已穿過乳頭狀組織；6小時已到達花柱的基部和子房腔區域；12小時通過胚珠且有部份胚珠已受精；在18小時已延伸達子房2/3的地方，約在24小時花粉管可到達子房基部；其過程非常迅速，和甜瓜很類似[11]。因爲苦瓜的橫隔和假種皮間相連的特殊構造，使得花粉管的延伸也是比較特別，可以引導花粉管一直沿著細胞細小而密集的特殊組織構造前進，有保護花粉管的延伸及確保受精成功的作用。另外還有一個現象，當苦瓜花粉管延伸時，常見多條的花粉管在胼胝質(callose)豐富區黏結成一束，再各自向不同胚珠方向前進，此一結構似乎是有利於花粉管的延伸，但仍有待試驗及分析證明。

當花粉發芽一小時後即可看到核的分佈，苦瓜的精細胞約在花粉管延伸200～400 um之後出現，而管核則位於花粉管尖端區，和一般花粉管的生長相類似[5]。當花粉粒發芽，花粉管剛伸長時，花粉管前端缺少細胞壁，在花粉管的頂端帶(apical zone, 又稱帽區)是單層，在次頂端帶有內層出現，此帶之後管壁逐漸增厚，慢慢生成細胞壁[12,20]。將發芽的苦瓜花粉管尖端置高倍顯微鏡下，亦可看到不具

花粉管壁或管壁極薄的帽區。這種類似原生質體狀態的發芽花粉管，在沒有胞壁的阻擋與影響下，利用電擊(電穿孔)的方法很容易讓外來的DNA進入，可進行基因轉殖的工作[24]；此種不必經由組織培養再生系統的基因轉殖方法，將極具吸引力與發展潛力。

據調查，苦瓜雌花在開花前兩天下午，若授以新鮮花粉(預先冷藏處理)則少部份會著果，但因受精不完全，這些膨大的畸形果，祇收到少許種子；但有些膨大果具單維結果(parthenocarpy)現象，因而收不到種子。而開花前一天不論上午或下午，授以新鮮花粉均有正常果產生，此結果顯示苦瓜雌花在開花前一天，即有很好的受精結實能力。在開花當天上下午授粉均可結實，此點則和Trivedi[22]所述相同；但下午授粉時，受精不完全果的比例較上午授粉爲高，且若改授以置室溫下的花粉(無冷藏處理)，則受精不完全果的比例更高，可達60%以上(未發表資料)，也就是說在一般狀況下，開花當天下午授粉的結實(種子)率顯著的下降，此點亦顯示開花當天下午的雌花，仍有很好的受精結實能力，但其授粉結實(種子)率低的原因，部份是受到花粉活力的影響。開花後一天上、下午雖仍可結果，但都是屬於受精不完全的畸形果，且整體的著果率已急速下降至25%以下。而開花後兩天，則已全無著果能力了。綜合以上結果現象可知，苦瓜雌花於開花前兩天下午(傍晚)到開花後一天下午(傍晚)，均具有受精、結實(種子)能力，而以開花前一天下午到開花當天下午的授粉結實率爲佳。另調查苦瓜雄花的花藥開裂情形，結果顯示雄花在開花前一天晚上，約十一點以後，藥壁即陸續開裂，並露出成熟的花粉。

引用文獻

1.王進生。1993。苦瓜。園藝之友。41:35-40。

2.李揚漢。1991。蔬菜解剖與解剖技術: 第六章蔬菜花的形態與解剖和第七章蔬菜果實和種子的解剖。第252-324頁。農業出版社。北京。

3.肖春英、張日藻。1987。苦瓜-(浙江農業大學主編)。蔬菜栽培學各論(南方二版)。第287-289頁農業出版社。北京。

4.郁宗雄。1982。苦瓜一梁 鷚(主編)。瓜類栽培(增訂三版) 。豐年社出版。台北。pp.150-156。

5.胡適宜。1990。被子植物胚胎學。曉園出版社有限公司。台北。307頁。

6.黃義雄。1996。由常見果實認識植物演化。國立自然科學博物館出版。67頁。

7.楊文振。1995。高屏地區苦瓜產銷現況之探討。臺灣農業。31(5):17-22。

8.農林廳。1996。台灣農業年報一蔬菜。第64-103頁。中興新村。南投。

9.關佩聰。1985。苦瓜- 中國農業科學院蔬菜研究所(主編)。中國蔬菜栽培學。第607-611頁。農業出版社。北京。

10.岩佐俊吉。1980。熱帶的蔬菜--苦瓜(Bitter gourd)。第45-48頁。養賢堂。東京。

11.藤下典之。1973。甜瓜植物的特性。第基1~31頁。農業技術大系-野菜編。農山漁村文化協會編印。東京。

12.Cass, D.D., and D.J. Peteya. 1979. Growth of barley pollen tubes in vivo. I. Ultrastructural aspects of early tube growth in the stigmatic hair. Can. J. Bot. 57: 386-396.

13. Deshpande, A.A., V.K. Subbaiah, V.M. Bankapur, and U.G. Nalawadi. 1979. Studies of floral biology of bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Mysore J. Agri. Sci. 13:156.

14. Deshpande, P.K., S.M. Bhuskute, and K.H. Makde. 1986. Microsporogenesis and male gametophyte in some *Cucurbitaceae*.Phytomorphology 36(1,2):145-150.

15. Esau, K. 1977. Anatomy of Seeds Plants. John Wiley & Sons, New York.

16. Gahan, P. B. 1984. Plant histochemistry and cytochemistry. Academic Press, London. pp.195-200.

17. Goffinet, M.C. 1990. Comparative ontogeny of male and female flowers of *Cucumis sativus*. In: Biology and Utilization of the Cucurbitaceae, Bates, D.M., R.W. Robinson and C. Jeffery(eds.), Cornell University Press, New York. pp. 288-304.

18.Kho, Y.O., and J. Baer. 1968. Observing pollen tubes by mean of fluorescence. Euphytica 17:298-302.

19.Mauseth, J.D. 1988. Plant Anatomy. Benjamin/Cummings Publishing Company. California. 560p.

20.Picton, J.M., and M.W. Steer. 1982. A model for the mechanism of tip extension in pollen tubes. J. Theor. Biol. 98:15.

21.Singh, D., and A.S.R Dathan. 1990. Seed coat anatomy of the *Cucurbitaceae*. In: Biology and Utilization of the *Cucurbitaceae*, Bates, D.M., R.W. Robinson, and C. Jeffery (eds.), Cornell University Press, New York, pp. 225-238.

22.Trivedi, D.P. 1983. Morphological and genetical studies in bitter gourd (*Momordica charantia* L.). Kanpur University, India,Thesis.

23.Van Rensburg, H.J., P.J. Robbertse, and J.G.C. Small. 1985. Morphology of the anther, microsporogenesis and pollen structure of *Momordica balsamina.* S. Afr. J. Bot. 51:125-132.

24.Van Wert, S.L., and J.A. Saunders. 1992. Reduction of nuclease activity release from germinating pollen under conditions used for pollen electrotransformation. Plant Sci. 84:11-16.

Observation of Fruit Anatomy and Development of Bitter Gourd

I. Fruit Anatomy and Fertilization of Bitter Gourd[1]

You-Ming Chang , Pan-Chi Liou, Chi-Hsiung Hsiao[2]
and Chou-Tou Shii[3]

Summary

The female flower of bitter gourd (*Momordica charantia L.*) consists of an inferior ovary and a three-lobed and wet stigma on a columnar style which is hollow. The ovary contains three carpels, each with 14-18 ovules, surrounded by ovary wall. Anatropous ovules attach to "parietal placenta". Two row of ovules in each carpel are aligned irregularly in either erect or pendulous, but not in horizontal position. Unlike other cucurbits, at each cross-section in bitter gourd ovary, no more than 4 ovules, can be seen. Although the number of ovule in an ovary can be up to 60, the average in around 40. The lobed stigma is aligned in "U" shape on the top of style. One hour after pollination, the pollen tubes penetrated into papillae tissue in this study. All pollen tubes from 3 lobed stigma, joining in style, arrived to ovary cavity 6 hours after pollination. Fertilization first occurred during the next 6 hrs and finished during 18~24 hrs after pollination. The number of pollen tubes rapidly decreased along with time course of elongation. Hardly any pollen tubes could be seen at the basal end of the ovary. One hour after pollen germination, the generative nucleus entered the pollen tube.

Key words: Bitter gourd (*Momordica charantia L.*), Fruit anatomy, Pollen tube, Fertilization.

1.Contribution No. 1997 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2.Respectively, Assistant Horticulturist, Associate Horticulturist, Senior Horticulturist and Head, Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3.Professor, Department of Horticulture, National Taiwan University. Taipei, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 32～41 (1999)

γ－射線照射蔓綠絨組培苗莖段之誘變研究[1]

陳威臣 蕭翌柱 蔡新聲[2]

摘要：利用組織培養配合γ-射線照射的處理方式，誘導蔓綠絨(*Philodendron*)產生變異，期由變異體中發現具有優良性狀的個體以做爲品種開發的基礎。結果顯示，泡泡蔓綠絨莖段培養於含有2.0 mg/l BA (N^6-benzyladenine)或0.5 mg/l TDZ (thidiazuron)的MS液態培養基預處理2星期，再接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA (α-naphthaleneacetic acid)的MS固態培養基培養6星期後，每個培植體可誘導萌發5.8與5.6芽體，效果較佳。泡泡(*P.* *cv.* 'Tuxla')、綠帝王(*P.* cv. 'Imperial Green')、鋸齒(*P.* cv. 'Pluto')及紅公主(*P.* cv. 'Red Princess')蔓綠絨莖段培養於1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA的MS固態培養基，均可達大量繁殖的目的。紅公主蔓綠絨經γ-射線照射處理後產生葉片呈黃色、淡黃色、白綠斑紋或黃綠斑紋的變異植株；這些黃色、淡黃色或黃綠斑紋的異常植株，分離培養時均可大量繁殖，而白綠斑紋的異常植株，分離培養後往往消失此性狀。泡泡、綠帝王與鋸齒蔓綠絨經γ-射線照射處理後，並無顯示可見的形態變異。

關鍵詞：γ-射線、蔓綠絨、組織培養、形態變異。

前　　言

近年來，觀賞植物是單位面積產值最高的農作物產品之一，且大多採用組織培養以達到大量繁殖的目的，預估在公元2,000年美國觀賞植物組培苗的市場可擴大到三十億美元，其中以觀葉植物的47%最爲重要。此外，爲了因應加入世界貿易組織(WTO)的衝擊與進軍國際市場的強烈競爭，開發並掌握自有品種是首要的目標。蔓綠絨爲天南星科、蔓綠絨屬之多年生、熱帶、耐陰性之草本觀葉植物，只要稍加注意水分及光線，就能生長茂盛且綠意盎然，是一種容易栽培的室內盆栽植物；依1997年農林廳對台灣地區草本觀葉類盆栽的統計資料顯示，蔓綠絨盆栽之數量約有70萬盆(佔16.3%)，產值達3千1百萬元(佔22.1%)，兩者均屬觀葉植物中最高，是一種相當重要的觀葉類盆栽植物；利用組織培養可大量繁殖蔓綠絨植株，且已經應用於種苗生產事業[2,4,5,7,9,18,23,27]。

植物變異體的獲得來自自發突變及人爲誘變：自發突變是一偶發的事件，且不利的變異遠較有利者多，對於育種上之效用不大；人爲誘變則包括如利用EMS(ethyl methanesulphonate)、疊氮化鈉(NaN_3)、秋水仙素(colchicine)、X-射線、γ-射線、中子、放射性同位素、高溫處理、加齡種子或老熟的花粉授精等化學的、物理的及生物的方法，均可誘導變異體的產生，惟目前較常用且有效的僅有放

1. 行政院農業委員會 農業試驗所 研究報告 第 1998 號。

2. 本所農藝系助理研究員、助理與研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

射線照射及某些化學藥劑處理，其中以γ-射線佔55.5% 最多、其次爲X-rays(28.4%) 、化學誘變劑(9.2%) 及中子(4.8%)等誘變處理，而中國大陸利用γ-射線進行誘變育種的比率更高達80.1%，可知利用γ-射線照射植物之人爲誘變是目前較常用且較爲有效的方法[1,3,13,21]。

觀賞植物的新品種最重要的就是新奇變化，因此也最適合利用誘變育種以獲得有用的突變個體；大多數觀賞植物爲維持其親本之優良特性均採用無性繁殖之方式，近年來大多採用組織培養達到大量繁殖的目的；傳統育種行爲對於染色體爲高度異質結合之無性繁殖作物相當困難，因此誘變育種乃成爲無性繁殖作物品種改良與開發的利器，而許多新品種更來自於體細胞的突變[1,2,3,4,5,8,9]。組織培養已廣泛應用於觀賞植物種苗之生產事業；γ-射線照射是近年來利用最多且較爲有效的一種誘變方法，若利用組織培養配合γ-射線照射之人爲誘變的處理方式，對於觀賞植物育種及產業品種開發應有極大的幫助；誘變往往產生如變異的方向難以控制、不良變異的比例偏高或出現無法經由有性世代遺傳的鑲嵌體等限制，若能配合組織培養則能經由培養基和培養環境的選擇而控制變異和選種的方向，得以減輕這些限制而獲得許多有用的變異體，因而具有傳統誘變育種所無法替代的一些優點[1,3,8,9,10,11,13,14,17,19,20,21,24,25,27]。

無論何種形式的植物組織培養，其培植體都必須具有芽體或體胚的發生能力，才能再生植株以供誘變育種之用；利用莖頂或側芽進行誘變處理時，以處理尚未長出的芽體效果較好[3]。本研究主要以蔓綠絨爲材料，嘗試利用γ-射線照射蔓綠絨無菌苗之莖段，進行以組織培養結合誘變處理之品種改良或創新，研究其做爲觀賞植物品種開發之可行性，所得結果應可提供園藝作物育種及產業品種開發之應用。

材料與方法

一、材料

本研究之材料係由行政院農業委員會種苗改良繁殖場提供之泡泡蔓綠絨(*Philodendron* cv. ‘Tuxla’)、綠帝王蔓綠絨(*P.* cv.‘Imperial Green’)、鋸齒蔓綠絨(*P.* cv.‘Pluto’)及紅公主蔓綠絨 (*P.* cv. ‘Red Princess’)之無菌瓶苗。

二、方法

(一) 培植體來源：將各品種之蔓綠絨瓶苗培養於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基，使其繁殖到相當苗數後進行後續之試驗。

(二) 培養基配製：本研究主要以MS(Murashige and Skoog, 1962)[22]無機鹽類及有機成分爲基本配方，且內含3%蔗糖及0.9%洋菜，並添加植物生長調節劑，培養基加入洋菜前先以1N NaOH及HCl將pH值調至5.7±0.1，然後以121℃、1.05 kg/cm^2(15 lb/in^2)高壓滅菌15分鐘後，放冷備用。液態培養基則不加洋菜，且pH值調至5.2±0.1。

(三) 培養環境：固態培養是將材料置於25±1℃之恆溫、照光16小時(約2,000 lux)培養；液態培養則在25±1℃之恆溫、照光16小時(約200 lux)的條件下，置於水平迴轉式振盪器上，以100 rpm之速度振盪培養。

(四) γ-射線照射處理之劑量、速率與方式：本研究採用鈷六十(^{60}Co)之放射源，其劑量依試驗的不同分別爲預試驗之0、10、50、150與250 Gy及誘變處理之20、40 Gy；照射速率爲14.1 Gy/h；照射時之室溫約爲25℃；照射之方式則是將經過芽體誘導處理後之蔓綠絨莖段，接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA的MS固態培養基的無菌塑膠培養皿中，每個培養皿接種25個莖段培植體，以供進行γ-射線照射處理之用。

(五)試驗處理與調查方法：

1.泡泡蔓綠絨芽體誘導

利用除去葉片及頂芽的瓶苗莖段(約1.5公分，含3~4個節)作爲培植體，培養於含有不同濃度BA或TDZ之MS液態培養基，每處理含20個培植體，以100 rpm的振搖速度培養兩星期後，再移至含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基培養6星期後，調查BA與TDZ對泡泡蔓綠絨芽體誘導之影響。

2.泡泡蔓綠絨莖段之γ-射線照射處理預試驗

γ-射線照射處理預試驗是將未經芽體誘導處理之泡泡蔓綠絨莖段(約1.5公分，含3~4個節)，直接以0、10、50、150及250 Gy吸收劑量的γ-射線照射(每處理含60個培植體)處理後，接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基，培養30天、60天及90天後調查存活率與生長情形；於培養後30天及60天的調查是以培植體上是否有芽體形成作爲存活的標準，培養後90天之調查則是以芽體可否長成具有葉片之小苗爲依據。

3.泡泡、綠帝王、鋸齒及紅公主蔓綠絨之繁殖與γ-射線照射處理試驗

將泡泡、綠帝王、鋸齒及紅公主蔓綠絨之莖段，培養於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基，觀察其生長發育之情形，並可生產足量之蔓綠絨小苗以供試驗之用。經芽體誘導處理且接種於無菌塑膠培養皿之各品種蔓綠絨莖段，分別以20及40 Gy吸收劑量的γ-射線照射處理後，再移植接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之新鮮MS固態培養基，培養後30天、60天及90天調查存活率與生長情形；於培養後30天及60天的調查是以培植體上是否有芽體形成作爲存活的標準，培養後90天之調查則是以芽體可否長成具有葉片之小苗爲依據。

結　果

一、泡泡蔓綠絨芽體誘導試驗

試驗結果如表1所示，2.0 mg/l BA及0.5 mg/l TDZ兩處理分別可產生5.8及5.6個芽體，誘導芽體之效果最佳，其次爲4.0 mg/l BA 之5.0 芽/培植體，而其餘處理之結果均低於此芽數，分別爲0.1 mg/l TDZ 處理之4.9芽/培植體、1.0 mg/l TDZ處理之4.3芽/培植體、1.0 mg/l BA處理之3.3芽/培植體，以及對照組的3.0芽/培植體。

表1. BA及TDZ對泡泡蔓綠絨芽體形成之影響

Table 1. Effect of BA and TDZ on induction of multiple shoots from stem node explants of *Philodendron* cv. 'Tuxla'

Plant growth regulator (mg/l)		No. of shoots produced per stem node explant
BA	TDZ	
0	0	3.0 ±1.1 [z]
1.0	0	3.3 ±1.6
2.0	0	5.8 ±1.5
4.0	0	5.0 ±1.3
0	0.1	4.9 ±0.9
0	0.5	5.6 ± 1.4
0	1.0	4.3 ± 1.0

[z] Mean ± Standard deviation

二、泡泡蔓綠絨莖段之γ-射線照射預試驗

γ-射線照射預試驗之結果如表2所示。培養60天後的調查發現，10 Gy之處理的存活率高達100%，最後之存活率爲95%且無白化現象，平均每個培植體可形成小苗數爲4.2芽，顯示其生長勢與對照組(平均爲4.5芽/培植體)的差異不大。但吸收劑量爲150及250 Gy處理之葉片大部份發生白化現象，且最後均無芽體產生，甚至褐化死亡。而50 Gy之處理在初期時雖有40%的培植體上有芽體，但最後調查時芽體並無生長之跡象。

表2. 不同劑量γ-射線照射處理對泡泡蔓綠絨莖段培植體之影響

Table 2. Effect of different dosages of γ-rays on stem node explants of *Philodendron* cv.‘Tuxla’; the explants were cultured on MS medium with 1.0 mg/l BA and 0.2 mg/l NAA after treatment with γ-rays

Dosage of γ-rays	% survival of explants		% explants producing shoots		No. of shoots produced per explant
(Gy)	60[z]	90[z]	60[z]	90[z]	90[z]
250	0	0	0	0	0
150	6.6	0	0	0	0
50	40.0	0	0	0	0
10	100	95.0	90.0	95.0	4.2 ± 1.0
Control	100	100	100	100	4.4 ± 0.9

[z]Days after culture

三、蔓綠絨瓶苗之繁殖及γ-射線照射劑量對蔓綠絨芽體之影響

將泡泡、綠帝王、紅公主與鋸齒蔓綠絨之莖段，接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基，此四種蔓綠絨均可繁殖良好且發根(圖1A, 1B, 1C, 1D)，顯示其莖段培養於此培養基時，都具有芽體發生的能力以供誘變育種之用。

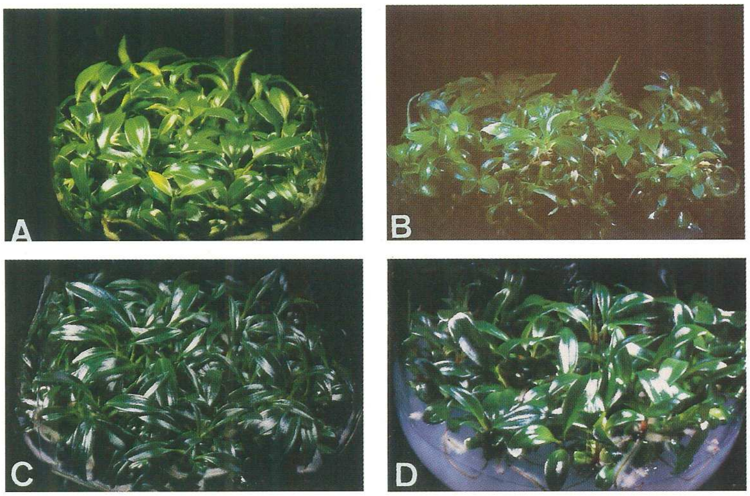


圖1. 蔓綠絨莖段培養於含有1.0 mg/l BA或0.2 mg/l NAA之MS培養基可建立蔓綠絨芽體大量繁殖。(A)泡泡蔓綠、(B)綠帝王蔓綠絨、(C)鋸齒蔓綠絨、(D)紅公主蔓綠絨。

Fig.1. Multiple shoot formation in stem node explants of four cultivars of *Philodendron* when cultured on MS medium with1.0 mg/l BA and 0.2 mg/l NAA. (A) *Philodendron* cv.‘Tuxla’, (B) *Philodendron* cv.‘Imperial Green’, (C)*Philodendron* cv.‘Pluto’, (D) *Philodendron* cv.‘Red Princess’.

蔓綠絨莖段經γ-射線照射處理的結果如表3所示，泡泡蔓綠絨在20 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別顯示高達90%與85%之存活率，但在接種90天後則有部分培植體上之芽體無法長成小苗，故僅有47%之存活率；40 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別有80%及70%之存活率，但接種90天後則僅有12%之存活率。綠帝王蔓綠絨在20 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別有88.6%及70%的培植體可萌發芽體，但接種90天後則僅有28.6%培植體上之芽體可長成小苗；40 Gy之處理條件下，接種30及60天後分別有71.4%及42.9%之存活率，但最後這些芽體均無法繼續生長。鋸齒蔓綠絨在20 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別有85%及50%之存活率，而接種90天後亦有47.5%之培植體存活；40 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別有62.5%及20%之培植體存活，且這些培植體上之芽體於接種90天後均可長成小苗。紅公主蔓綠絨在20 Gy之處理條件下，於接種30及60天後有73.3%及66.7%之存活率，且這些培植體上之芽體於接種90天後均可長成小苗；40 Gy之處理條件下，於接種30及60天後分別有50%及33.3%的存活率，但接種90天後的存活率僅6.7%。

四、蔓綠絨經γ-射線照射處理之誘變結果

泡泡、綠帝王與鋸齒蔓綠絨經γ-射線照射結果顯示，20 Gy之處理，分別可獲得256、89與228株小苗；而40 Gy之處理，僅分別獲得65、0與103株小苗；且並未發現任何植株顯示外表形態上的變異(表3)。紅公主蔓綠絨經γ-射線照射處理後之結果顯示，在40 Gy的處理條件下獲得22株小苗，亦無可見的形態變異發生；而在20 Gy的處理中可發現數種葉片爲黃色、淡黃色、白綠斑紋或黃綠斑紋的異常植物體(圖2A, 2B)；在193株小苗中有16株異常植物體(表3)，包括黃色葉片有8株、淡黃色葉片有4株、白綠斑紋者有2株，以及黃綠斑紋者有2株。將其分離培養於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基可產生同爲異常植物體的大量小苗(圖2C)，異常植物體中之白綠斑紋者，往往在分離培養過程中消失此特性狀，而黃綠斑紋者則可繼續生長且增殖；部分異常植物體在分離培養後卻產生白化現象，最後則褐化死亡。

表3. γ-射線照射處理對不同品種蔓綠絨芽體存活與變異發生之影響

Table 3. Effect of γ-rays (20 and 40 Gy) on survival of stem node explants and recovery of variants in four cultivars of *Philodendron*；the explants were cultured on MS medium with 1.0 mg/l BA and 0.2 mg/l NAA after treatment with γ-rays

Variety	Dosage of γ-rays (Gy)	No. of explants treated	% survival of explants			Total No. of shoots produced	No. of variants recovered
			30 [z]	60 [z]	90 [z]		
'Tuxla'	20	100	90.0	85.0	47.0	256	0
	40	100	80.0	70.0	12.0	65	0
'Imperial Green'	20	70	88.6	70.0	28.6	89	0
	40	70	71.4	42.9	0.0	0	0
'Pluto'	20	80	85.0	50.0	47.5	228	0
	40	80	62.5	20.0	20.0	103	0
'Red Princess'	20	60	73.3	66.7	66.7	193	16
	40	60	50.0	33.3	6.7	22	0

[z] Days after culture.

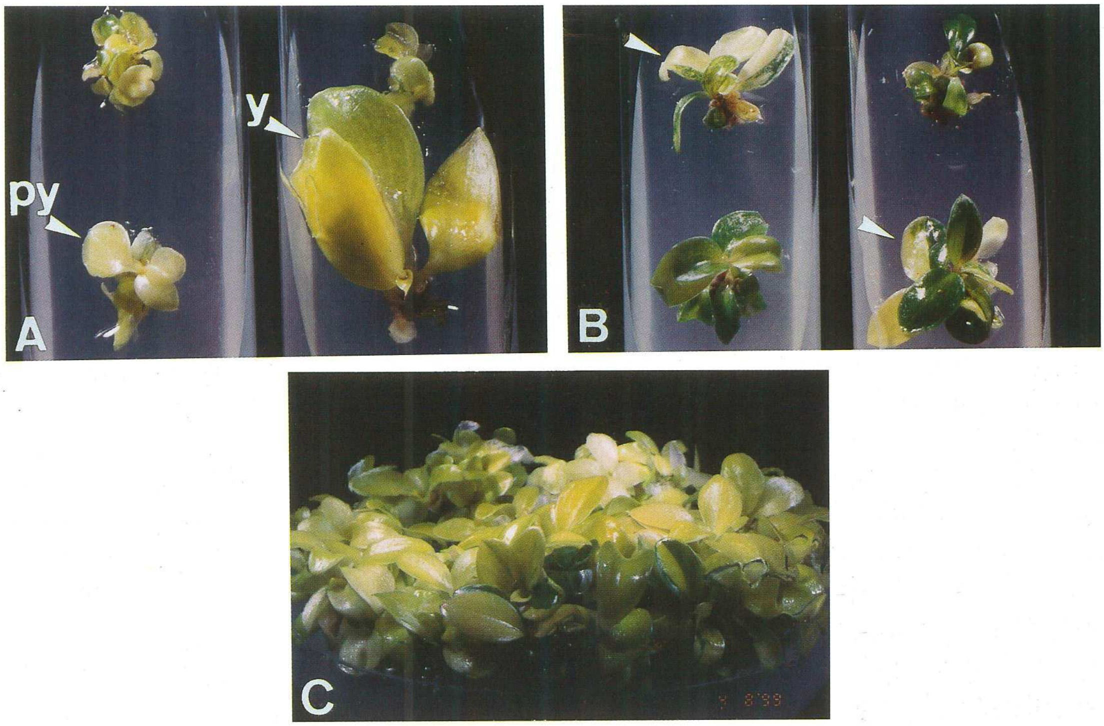


圖2. 紅公主蔓綠絨經20 Gy吸收劑量之γ-射線照射處理後產生之(A)黃色(y)及淡黃色(py)葉片之變異植株、(B)具斑紋葉片(箭頭所示)之變異植株、(C)變異植株之大量繁殖。

Fig.2. Morphological variants of *Philodendron* cv. 'Red Princess', recovered after treatment of stem node explants with γ-rays dosage of 20 Gy. (A) Shoots with yellow (y) or pale yellow (py) color leaves, (B) shoots with variegated (arrows) leaves, (C) micropropagation of morphological variants.

討　　論

本研究以泡泡、綠帝王、紅公主及鋸齒等四個蔓綠絨品種爲材料，利用組織培養技術配合γ-射線照射誘變處理，做爲品種改良或創新之方式，對於品種開發及育種應用應有所幫助。

無論何種培植體都必須具有芽體或體胚的發生能力，才能供誘變育種之用；利用莖頂或側芽進行誘變處理時，以處理尚未長出之芽體的效果較好[3]。本研究首先以泡泡蔓綠絨莖段進行BA與TDZ對芽體誘導的影響，以及莖段對γ-射線照射吸收劑量的敏感度測試。試驗結果顯示，泡泡蔓綠絨莖段經過2.0 mg/l BA或0.5 mg/l TDZ之液態培養前處理，在培養兩個月後分別產生5.8與5.6個芽體，大量繁殖之效果最佳。林與司(1995)的報告指出，組培苗對於γ-射線照射的半致死吸收劑量約在20~50 Gy之間[6]。本研究初期預試驗是利用泡泡蔓綠絨之莖段，採用較大範圍的吸收劑量(0、10、50、150及250 Gy)進行測試，依結果預估，其半致死吸收劑量應在10~50 Gy之間，此結果與上述報告所述差異不大。因此，在後續的試驗中嘗試採用吸收劑量爲20或40 Gy之γ-射線照射處理，期可獲得有用的變異體以作爲蔓綠絨品種開發之用。

本研究將泡泡、綠帝王、鋸齒與紅公主蔓綠絨之莖段接種於含有1.0 mg/l BA及0.2 mg/l NAA之MS固態培養基，均可達到大量繁殖之目的，此結果顯示參試蔓綠絨之莖段都具有芽體發生的能力，可供誘變育種之用。前人研究指出，不同作物或品種對於γ-射線照射的輻射敏感度均不同，甚至於同一品

種之不同組織、器官或細胞的輻射敏感性亦有所差異，而適宜之輻射劑量也是相當重要的一個影響因子[1,6,8,10,14,16]。本試驗結果顯示，各品種蔓綠絨對γ-射線照射的敏感度的確有所差異，在20 Gy的處理條件下，泡泡、綠帝王鋸齒與紅公主蔓綠絨之存活率分別爲47%、28.6%、47.5%與66.7%，因此其適當的處理劑量約在20 Gy左右，但由於沒有進一步測試，故無法指出各品種之半致死劑量間的差異。許多報告雖利用不同的培植體進行試驗，但其適當的處理劑量則大約在8~35 Gy之間，如菊花的頂芽、腋芽(20~30 Gy)或癒合組織(8~16 Gy)[8]、金銀花(*Lonicera* sp.)的頂芽(35 Gy)或側芽(21 Gy)[12]、*Alpinia purpurata*的側芽(30 Gy)[14]、非洲菊(*Gerbera jamesonii*)的葉片來源不定芽(20或25 Gy)[15]、非洲菊(*Gerbera jamesonii*)的小苗(20 Gy)[17]、野芋(*Colocasia esculenta*(L.) Schott)的莖梢(10~15 Gy)[19]與菊花的葉片(10~20 Gy)[26]。Micke(1993)指出，大部分組織培養的適用劑量約在10~30 Gy之間[21]。本研究結果(10~40 Gy)與上述結果極爲類似。因此，本研究利用經芽體誘導處理但未形成芽體的蔓綠絨莖段，採用10~20 Gy吸收劑量的γ-射線照射處理，除可誘導產生多量芽體外，亦可達到適宜輻射劑量而產生較大的誘變效果。

輻射誘變育種對於觀賞植物而言，往往導致花的顏色、花的形態、花的尺寸、花期、花數、斑葉、株高等性狀的改變[11,12,16,17,21,26]。本試驗結果顯示，泡泡、綠帝王與鋸齒等三種蔓綠絨經20及40 Gy之γ-射線照射處理後，分別獲得321、89與331株之處理植株，但目前並未發現外表形態上的變異。而紅公主蔓綠絨經20 Gy之γ-射線照射誘變處理後，可發現8.3%的葉色異常植物體，分別爲黃色、淡黃色、白綠斑紋或黃綠斑紋葉片的異常植物體，將其分離培養時可增殖產生大量小苗，且繼代培養後黃色與淡黃色葉片變異的特性不會消失，應屬於一個相當穩定的突變體，但後續的觀察中卻發現株高有矮化的現象；而具有白綠或黃綠斑紋葉片的異常植物體則是鑲嵌體，因黃綠斑紋之變異體可在分離培養時繼續顯現此變異，而白綠斑紋之變異體則在分離培養後消失其白綠斑紋之性狀。鑲嵌體是因爲突變與正常之細胞分布於不同的細胞層中，因細胞之生長方式、二倍體選擇或個體衰老等因素，將形成完全的突變或回復爲正常植體，而無法保有此鑲嵌體的變異[5,8,12,23,24]；此變異或可利用無性繁殖的方式維持，但無法經由種子遺傳至下一代，然而此現象往往是利用化學藥劑處理試管外之植物體時才易發生[3]；Jerzy與Zalewska(1997)於非洲菊與菊花的研究中發現，當利用葉片形成不定芽來繁殖鑲嵌體時，往往回復成原來的顏色，惟有利用莖頂生長點培養時方能保有此變異[16]。本研究獲得之異常植物體矮化的特性，是暫時的現象抑或是突變的結果呢?此外，何以黃綠斑紋比白綠斑紋之特性較易於分離培養時繼續保存?這些現象均有待進一步之觀察與研究。

本研究以紅公主蔓綠絨利用γ-射線照射之誘變處理，雖獲得數種穩定的變異體，但其可利用性則有待育種家或產業界進一步的評估選拔；此外，本研究所獲得之變異體的純化、維持及選拔工作仍持續進行，期能由這些變異個體中獲得有用的突變體；而本研究僅就蔓綠絨形態異常之植株作爲觀察的對象，並無進行其他性狀的調查或基因方面的鑑定，未來在這方面值得進一步探討。如同郭等(1995)學者由育成14個菊花品種的結果證明，輻射誘變與組織培養的結合，可具有育種效率高與週期短的特點，於是提出-菊花無性繁殖的“輻射誘變與組織培養之復合育種技術路線”的論點[8]；而本研究之主要結論爲：結合組織培養與輻射誘變之方式，可有效的獲得且分離蔓綠絨變異體，對於作物育種與品種開發應有助益。

誌　謝

本研究承國科會補助經費(計劃編號：NSC 86-2622-B020-002、NSC 87-2622-B-020-001)，γ-射線照射處理承工研院化工研究所與行政院原委會核能研究所提供之設施與協助，文稿英文部份承A. P.

Sagare博士撥冗斧正，特此申謝。

引用文獻

1.王琳清。1995。誘發突變與作物改良，67-74頁。王琳清 等編。輻射誘變改良作物的綜合技術。原子能出版社，北京。

2.朱耀源。1991。花卉幼苗產業之發展。台灣花卉產業月刊 50：9-14。

3.何偉眞。1988。植物組織培養在誘變育種上的應用。國科會生命科學研究推動中心專刊第16集。國科會，台灣，台北。115-120頁。

4.何陽修。1995。花卉種苗繁殖之問題，43-53頁。柯立祥、陳福旗 編。台灣熱帶花卉產業發展研討會專輯，11月28-30日，1994，國立屏東技術學院，台灣，屏東。國立屏東技術學院印，台灣，屏東。

5.沈再木、郭繼如。觀葉植物的選育，145-157頁。陳榮五、周明燕 編。觀葉植物產業及生產技術研討會專刊，2月11-12日，1993，台灣省台南區農業改良場。台灣，台南。台灣省台南區農業改良場印。台灣，台南。

6.林音、司述明。1995。誘發突變與作物改良，192-198頁。王琳清 等編。γ射線輻射育種的輻照技術。原子能出社，北京。

7.盆栽花卉生產調查(四)草本觀葉類。1998。臺灣盆花調查報告，17頁。臺灣省農林廳編印，台灣，南投。...[無作者及主編資料之統計性期刊]

8.郭安熙、范家霖、楊保安、王柏楠、張建偉、陳樹國、王世榮、王然。1995。菊花花色輻射誘變研究。核農學報 11：65-73。

9.陳駿季、文紀鑾。天南星科觀葉植物組織培養及變異檢定技術之研究，676-690頁。沈再發 等編。園藝種苗科技研發成果發表會專集1月16-17日，1997，臺灣省農葉試驗所，台灣，台中。臺灣省農林廳種苗改良繁殖場印，台灣，台中。

10.鄭企成。1995。誘發突變與作物改良，385-392頁。王琳清 等編。離體誘變育種技術的發展和應用。原子能出版社，北京。

11. Ahloowalia, B. S. 1997. Improvement of horticultural plants through *in vitro* culture and induced mutations. Acta Hort. 447：545-549.

12.Cambecedes, J., M. Duron, and L. Decourtye. 1992. Methodology of *in vitro* gamma rays irradiations from *Lonicera* species；mutant description and biochemical characterization. Acta Hort. 320：119-126.

13.Dix, P. J. 1993. Use of chemical and physical mutagens *in vitro*, Section F-1 pp. 1-17. In：Lindsey, K. ed. Plant tissue culture manual-fundamentals and applications. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.

14. Fereol, L., S. Louis, and L. Luce. 1996. Effects of gamma radiation on *in vitro* plantlets of *Alpinia purpurata.* J. Hort. Soc. 71：243-247.

15.Jerzy, M., and M. Lubomski. 1992. *In vitro* adventitious bud techniques for mutation breeding of *Gerbera jamesonii.* Acta Hort. 314：269-274.

16.Jerzy, M., and M. Zalewska. 1997. Flower colour recurrence in chrysanthemum and gerbera mutants propagated *in vitro* from meristems and leaf explants. Acta Hort. 447：611-614.

17.Laneri, U., R. Franconi, and P. Altavista. 1990. Somatic mutagenesis of *Gerbera jamesonii* Hybr.：Irradiation and *in vitro* culture. Acta Hort. 280：395-402.

18.Levin, R., V. Gaba, B. Tal, S. Hirsch, D. De-Nola, and I. K. Vasil. 1988. Automated plant tissue culture for mass propagation. Bio/Technology 6：1035-1040.

19. Malamug, J. J. F., S. Yazawa, and T. Asahira. 1994. Morphological variants induced from shoot tips of taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) treated with gamma radiation. Sci. Hort. 58：105-113.

20. Maluszynski, M., B. S. Ahloowalia, and B. Sigurbjornsson. 1995. Applications of *in vivo* and *in vitro* mutation techniques for crop improvement. Euphytica 85：303-315.

21. Micke, A., and B. Donini. 1993. Induced mutations, pp. 52-62. In：Hayward, M. D., Bosemark, N. O., and Romagosa, I. eds. Plant breeding - Principles and prospects. Chapman & Hall, London, UK.

22. Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol.

Plant. 15：473-497.

23. Queralt, M. C., Beruto, M., Vanderschaeghe, A., and P. C. Debergh. 1991. Ornamentals, pp. 215-229. In：Debergh, P. C., and Zi. mmerman, R. H. eds. Micropropagation-technology and application. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.

24. Skirvin, R. M., K. D. McPheeters, and M. Norton. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. HortScience 29：1232-1237.

25. Skirvin, R. M., M. Norton, and K. D. McPheeters. 1993. Somaclonal variation：has it proved useful for plant improvement? Acta Hort. 336：333-339.

26. Zalewska, M., and M. Jerzy. 1997. Mutation spectrum in *Dendranthema grandiflora* Tzvelev after *in vivo* and *in vitro* regeneration of plants from irradiated leaves. Acta Hort. 447：615-618.

27. Ziv, M., and T. Ariel. 1991. Bud proliferation and plant regeneration in liquid-culture *Philodendron* treated with ancymidol and paclobutrazol. J. Plant Growth Regul. 10：53-57.

Induction of Morphological Variants from Stem Node Explants of *Philodendron* after Treatment with γ-rays[1]

Uei-Chin Chen [2], Yih-Juh Shiau [2] and Hsin-Sheng Tsay [2]

Summary

Stem node explants derived from in vitro propagated shoots of four cultivars of *Philodendron* viz. *'Tuxla', 'Imperial Green', 'Red Princess', and 'Pluto'* were irradiated with γ-rays (20 and 40 Gy) to induce variation. The explants were pre-cultured in liquid Murashige and Skoog's (MS) medium supplemented with 2.0 mg/l N6-benzyladenine (BA) or 0.5 mg/l thidiazuron (TDZ) before irradiation. After irradiation, the explants were cultured on MS medium supplemented with 1.0 mg/l BA + 0.2 mg/l (-naphthaleneacetic acid (NAA) for production of multiple shoots. Morphological variants were observed only in cv. 'Red Princess'. Other three cultivars, though could be successfully propagated *in vitro*, failed to show any morphological variation after treatment with γ-rays.

Key words： γ-rays, *Philodendron*, Tissue culture, Morphological variation.

1. Contribution No. 1998 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. This study was supported by grants from National Sciences Council (NSC 86-2622-B020-002, NSC 87-2622-B020-001), Republic of China.

2. Respectively, Assistant Agronomist, Research Assistant and Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 42～51 (1999)

彩虹鳥蕉組織培養之研究
III. Cefotaxime和植物生長調節劑對莖頂培植體生育之影響[1]

蕭翌柱[2] 王才義[3] 蔡新聲[2]

摘要：本研究目的在探討cefotaxime抗生素預處理彩虹鳥蕉(*Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa)莖頂培植體對降低細菌污染及生育的影響，並探討以組織培養大量繁殖種苗的可行性。結果顯示，莖頂培植體接種於含MS基本鹽類並添加500 mg/l cefotaxime的液體培養基預培養3天後，再繼代培養於固體培養基，對降低細菌污染有顯著的效果，且不會對莖頂組織造成傷害。培植體培養於含MS基本鹽類並添加4-8 mg/l BA和0.5 mg/l NAA的培養基45天後，對促進新莖節萌發效果良好；而接種於含0.01-0.5 mg/l TDZ固體培養之莖頂培植體，也顯示有促進莖節快速生長的作用。另外，本試驗也探討不同的培養方式對彩虹鳥蕉新芽莖頂生育之影響，並獲得初步成果。

關鍵詞：Cefotaxime、Thidiazuron、彩虹鳥蕉、離體培養。

前　　言

彩虹鳥蕉爲赫蕉屬(*Heliconia*)植物，學名爲*H. psittacorum* cv. Rhizomatosa，目前台灣較具栽培規模之赫蕉屬切花除彩虹鳥蕉外，另有紅鳥蕉(*H. psittacorum* cv. Rubra)以及黃鸝鳥蕉(*H. psittacorum* cv. Golden Torch)。據1988年坊間出版之園藝圖書登錄介紹[4]，這三個品種引入台灣種植的時間應僅十餘年，但隨著經濟快速發展，國人生活水準也大幅提升，近年來此種花色多變且苞片豔麗、吸水性良好的切花材料，正逐漸受到關注與喜愛，更因形狀酷似天堂鳥花，故又有”小天堂鳥”的稱號。現今以屏東地區栽培較多[3]，但在中部試驗田區也能生育良好，尙未發現嚴重病虫危害且幾乎全年開花。

雖然此種熱帶花卉營養繁殖不難，但因具有假莖及如船形之苞片構造，易使植株內外滋生或潛藏各種害虫和菌類，在種苗或切花產品出口時引起檢疫困擾。例如，日本地區對於輸入的農業產品採取嚴格檢疫制度，依其植物保護法規定，進口植物不能帶有泥土，且凡是出口到日本的花卉必需具有由出口國家簽證的植物衛生檢驗證明文件，一旦發現有病原菌或虫害，必須由進口承銷商負責消毒、銷毀或退回[1]。美國夏威夷地區收集選育的赫蕉屬植物大多利用地下根莖萌生之新芽進行分株繁殖，因此曾在赫蕉類植株上檢驗出青枯病菌(*Pseudomonas solanacearum*(Smith))而被拒絕進口[19]。爲求台灣花卉產品能順利行銷國際市場，利用組織培養大量繁殖健康種苗應是值得研究的目標。

目前國內外從事赫蕉屬植物組織培養的研究尙不多見，相關文獻也以各栽培品種在植物學、生態

1.行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 1999 號。本文爲第一作者碩士論文之一部份。
2.本所農藝系助理、研究員。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
3.國立中興大學園藝學系副教授。台灣省 台中市。

學或形態學方面的描述較多，蕭等[5, 6]曾檢定出引起赫蕉培植體污染之細菌種類，並提出一些防治污染的方法；本試驗則以彩虹鳥蕉莖頂培植體爲材料，繼續進行組織培養研究，期能將研究成果應用於繁殖其它赫蕉屬植物種苗；在遠程目標方面更可藉由高劑量2,4-dichlorophenoxyacetic acid(2,4-D)、Ethyl methanesulphonate(EMS)藥劑處理分生組織或γ射線照射等誘變技術，進行新花色或新品種選育。

材料與方法

一、材料來源

試驗使用之彩虹鳥蕉材料，爲八十五年底自屏東地區收集的切花品種，定植於試驗田區及溫室苗床栽培後，生長良好可供作試驗之用。

在切取長約0.5-2公分左右的根莖新芽前，須先將植株連根掘起，經自來水沖洗乾淨後，用整枝剪自假莖中段剪斷去除葉片，其次將附著於根莖基部處枯死或腐爛的葉片基部及根系清除，只保留含根莖基部在內長約30-40公分的莖段。此種莖段經浸漬於含免賴得殺菌劑(Benlate, 含benomyl有效成份50%, 杜邦出品) 1000 mg/l水溶液2小時後，取出晾乾再直立排列於60cm ×42cm ×24cm塑膠籃內，莖基處覆以滅菌過的樹皮碎塊：發泡煉石(1：1, v/v)保濕，經3-4星期後根莖基部重新萌發側芽，以刀片切取供作試驗材料。

二、消毒方法與培養基配製

(一)消毒與殺菌

材料取得後，外部先以70％酒精溶液浸漬30-60秒或用酒精棉擦拭處理，再以市售之漂白水(Clorox,含5.25％有效成分)配製成含次氯酸鈉0.5％水溶液浸漬消毒15分鐘，殺菌液中添加數滴展著劑Tween 20(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate)以增加殺菌效率。

(二)培養基的配製

本試驗使用之培養基含MS(Murashige and Skoog, 1962)基本鹽類，並添加150 ml/l椰子汁(coconut milk, CM)、80 mg/l腺嘌呤(adenine)、170 mg/l NaH_2PO_4、3％蔗糖。並依試驗所需加入cefotaxime抗生素和植物生長調節劑(plant growth regulator, PGR)。植物生長調節劑的種類有(α-Naphthaleneacetic acid(NAA)、Benzylaminopurine(BA)及Thidiazuron(TDZ)等，這些藥品均事先配製成100-200 mg/l的母液，再依所需濃度稀釋之。

培養基調配完成後在添加凝膠物質前，先以0.5-1N NaOH或0.5N HCl調整酸鹼値(pH)，液體培養基之pH値爲5.2±0.1，固體培養基之pH値則爲5.7±0.1。培養基有固態及液態二種，欲配製固態者，需於液體培養基內另外添加0.9％ Difco agar，經煮沸融化後在每支內徑2.2cm的試管中分裝10ml。培養基分裝完成後置於殺菌釜內以溫度121℃、壓力1.05 kg/cm^{2}滅菌15分鐘後，取出放冷備用。

三、試驗方法

(一)Cefotaxime預處理對降低培植體受細菌污染之影響

1. 根莖新芽培植體經外部消毒後，依序去除外覆鱗片葉取得莖頂組織並分別接種於含0、25、50、100及500 mg/l cefotaxime之液體培養基震盪培養3天後，再繼代培養於含相同組成份但不含抗生素之固體培養基。
2. 每一處理重覆三次，每次各接種5支試管，每支試管接種1個培植體。培植體培養21天後，調查細菌污染的情形並記錄生育狀況。

(二)培養基添加BA與NAA對莖頂培植體生育之影響

1.根莖新芽培植體經外部消毒後，置於無菌操作台上用無菌水清洗三次，再將培植體依蕭等[6]提出之二次消毒技術進行處理，在取得莖頂組織後，分別培養於如表2所示之固體培養基45天，再繼代培養於含相同組成分之液體培養基45天，並調查莖節及根系生育的情形。

2.每一種處理重覆二次；根莖新芽每次各接種5支試管，每支試管接種1個培植體。

(三)培養基添加TDZ對莖頂培植體生育之影響

1.根莖新芽依前一項試驗所述方法處理後取得莖頂培植體，再全程培養於含0、0.01、0.05、0.1、0.5及1.0 mg/l TDZ之液體或固體培養基。

2.每一種處理各接種10支試管，每支試管接種1個培植體。培植體培養90天後調查培植體生育情形。

(四)不同培養方式對莖頂培植體生育之影響

1.根莖新芽依前一項試驗所述之方法處理並取得莖頂培植體後，分別培養於含8 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA或含0.01 mg/l TDZ之培養基。

2.培養方式分爲三種，分別爲L-L：以液體培養基培養45天後，再繼代於液體培養基45天；S-S：以固體培養基培養45天後，再繼代於固體培養基45天和S-L：先以固體培養基培養45天，再繼代培養於液體培養基45天。

3. 每一種處理樣本數皆與第三項試驗相同。

以上試驗之調查結果，係採用二項分佈(binomial distribution) 95%信賴區間(confidence limits)檢定處理間之差異；或以least significant difference(LSD5%) test 檢定之。上述各項試驗中培植體置於溫度24℃、光照12 hr、光量爲100 $\mu E/m^2 \cdot s$ 及光波長爲350-800 nm 環境下誘導萌生新芽；液體培養則在相同環境下，使用水平迴轉式震盪器以100rpm速率震盪培養。

結　果

一、Cefotaxime預處理對降低莖頂培植體受細菌污染之影響

莖頂培植體在已添加25、50或100 mg/l cefotaxime抗生素之液體培養基震盪培養3天後，再以固體培養基培養21天，結果其污染率分別爲86.7%、73.3%及66.7%，與對照組73.3%之污染率相較並無顯著差異(表1)；但抗生素濃度提高爲500 mg/l時，則污染率降低爲40%，與對照組差異顯著，且經調查也未對培植體造成明顯之傷害導致白化死亡(圖1)。

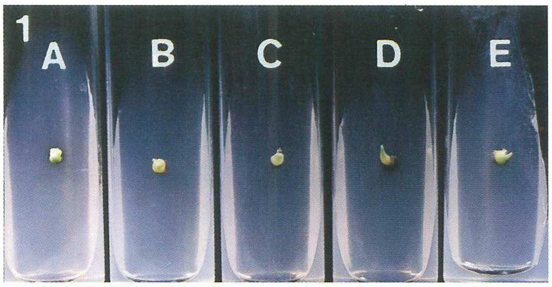
表1. Cefotaxime預處理對降低彩虹鳥蕉莖頂培植體污染之影響[Z]

Table 1. Effect of cefotaxime pretreatment on contamination and growth of shoot tip explants of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa[Z]

Cefotaxime (mg/l)	Contamination (%)	Growth of shoot tip explants (%)
0	73.3a[Y]	100.0a
25	86.7a	93.3a
50	73.3a	100.0a
100	66.7a	100.0a
500	40.0b	86.7a

[Z]Data from three independent experiments, each with 5 shoot tip explants per treatment.

[Y]Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5% level by least significant difference (LSD) test.



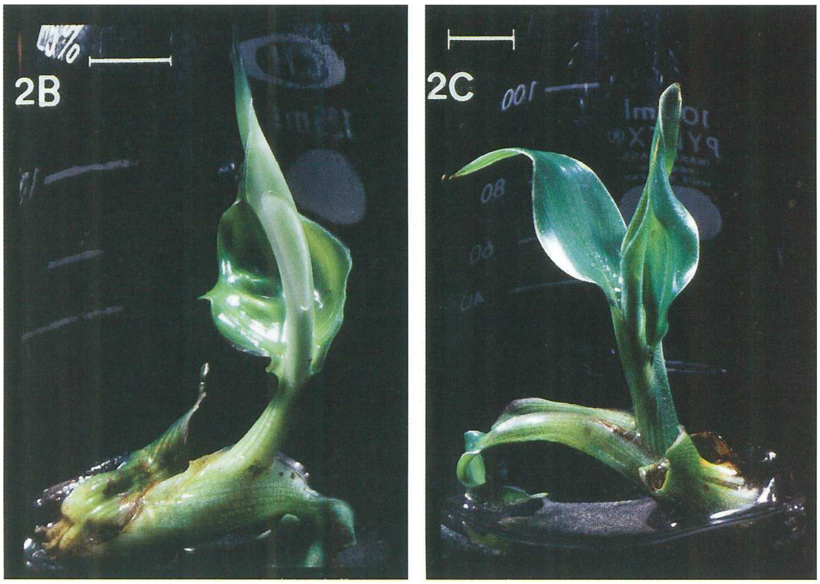


圖1. 不同濃度cefotaxime抗生素預處理彩虹鳥蕉莖頂培植體3天，再繼代培養於含MS基本鹽類並添加2 mg/l BA +0.5 mg/l NAA培養基21天對芽體生育之影響。由A至E分別為添加0、25、50、100及500 mg/l cefotaxime；圖中cefotaxime使用濃度達500 mg/l的處理組(E)仍未對植物組織產生毒害導致死亡。

Fig.1. Growth promotive effect of cefotaxime pretreatment in shoot tip explants of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa cultured for 21 days on MS basal medium supplemented with 2 mg/l BA +0.5 mg/l NAA. The explants were pretreated for 3 days with (A) 0 mg/l; (B) 25 mg/l; (C) 50 mg/l; (D) 100 mg/l and (E) 500 mg/l. Showed 500 mg/l cefotaxime was not harmful to the explant.

圖2. 含MS基本鹽類並添加不同種類生長調節劑培養基及不同培養方法對莖頂培植體誘導新莖節生長之影響。(A) 0.01 mg/l TDZ固體培養45天； (B) 0.01 mg/l TDZ固體培養45天再以液體培養45天；(C) 8 mg/l BA+0.5 mg/l NAA固體培養45天再以液體培養105天。(比例尺=1 cm)

Fig.2. Effect of culture method and growth regulators (TDZ, BA and NAA) on growth of shoot tip explants of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa. (A) Growth of shoot tip explant after 45 days of culture on agar-solidified MS medium supplemented with 0.01 mg/l TDZ; (B) Growth of shoot tip explant subcultured from agar-solidified MS medium to liquid MS medium supplemented with 0.01 mg/l TDZ. (Shoot tip was incubated for 45 days on solid medium before transfer and incubation for 45 days in liquid medium); (C) Growth of shoot tip explant subcultured from agar-solidified MS medium to liquid MS medium supplemented with 8 mg/l BA+0.5 mg/l NAA. (Shoot tip was incubated for 45 days on agar-solidified MS medium before transfer and incubation for 105 days in liquid medium) (Scale bar=1cm)

二、培養基添加BA與NAA對莖頂培植體生育之影響

表2結果顯示，莖頂培植體先接種於含MS基本鹽類並添加8 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA之固體培養基45天，再繼代培養於液體培養基45天後，約有70％之最高莖節萌生率，另根系萌生的比率僅有20％，平均發根數爲3.0。添加16 mg/l 較高濃度BA＋0.5 mg/l NAA之處理組，僅有20％的莖頂萌生莖節及10％有根系萌生，且幼嫩培植體在培養初期易褐化死亡。培植體培養於添加4 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA之處理組90天後，有50％的莖頂萌生莖節，40％有根系生長，平均發根數爲2.5。分別添加1和2 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA之二個處理組，培養後雖只有10％和20％的莖頂萌生新莖節，但培植體基部萌生根系的比率卻同樣高達70％，且平均發根數分別爲3.7及6.9；培植體如培養於僅含0.5 mg/l NAA之培養基，雖有50％有根系生長，但卻未有新莖節萌生，與對照組10％之莖節萌生率及30％根系生長率比較，差異不顯著。

表2.培養基添加不同濃度BA及NAA對彩虹鳥蕉新芽莖頂生育之影響[Z]

Table 2. Effect of BA concentration in combination with NAA on growth of shoot tip explants of *H psittacorum* cv. Rhizomatosa culture in MS basal medium lmedium [Z]

Plant growth regulator BA (mg/l)	NAA	Growth of shoot tip explants (%)	Root Induction (%)	Average no. of roots /explant
0	0	10b[Y]	30bcd	2.3
0	0.5	0b	50ab	3.4
1	0.5	10b	70a	3.7
2	0.5	20b	70a	6.9
4	0.5	50a	40bc	2.5
8	0.5	70a	20cd	3.0
16	0.5	20b	10d	3.0

[Z]Data from two independent experiments, each with 5 for shoot tip explants per treatment.
Explants were cultured on solid medium for 45 days and then subcultured in liquid medium for 45 days.
[Y]Means followed by the same letter in the same column are not significantly different at 5 % level by least significant difference (LSD) test.

三、培養基添加TDZ對莖頂培植體生育之影響

莖頂培植體接種於含0.01-0.1 mg/l TDZ的液體培養基45天後，有40-50％萌生新莖節，高於對照組之20％莖節萌生率(表3)；TDZ濃度如提高爲0.5 mg/l及1.0 mg/l，莖節萌生率反而降至20％及30％。此外，莖頂組織培養於含0.01 mg/l TDZ之固體培養基45天後發現，莖頂培植體全數萌生新莖節，顯著高於對照組之30％莖節萌生率；TDZ濃度如在0.05-0.5 mg/l，莖頂培植體之莖節萌生率也達80-90％；但過高濃度之TDZ(1 mg/l)，則使莖節萌生率下降爲40％。

表3. 液體和固體培養基中添加不同濃度TDZ對彩虹鳥蕉新芽莖頂生育之影響

Table 3. Effect of thidiazuron (TDZ) in liquid and agar-solidified MS basal medium on growth of shoot tipexplants of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa

TDZ (mg/1)	Shoot tips growing after 45days of culture in- Liquid medium		Solid medium(mg/l)	
	% explants growing	95%CL z	% explants growing	95%CL z
0	20	3-56	30	7-65
0.01	50	19-81	100	69-100
0.05	40	12-74	80	44-97
0.10	50	19-81	90	55-100
0.50	20	7-65	80	44-97
1.00	30	7-65	40	12-74

[Z]95 % confidence limits of binomial distribution.

四、不同培養方式對莖頂培植體生育之影響

表4結果顯示，莖頂培植體先以含8 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA之固體培養基培養45天後，再繼代培養於含相同組成份之液體培養基45天(S-L式培養)，新莖節萌生率高達70%，且莖頂組織褐化率僅30%；優於全程使用液體培養(L-L式培養)之30%莖節萌生率與70%褐化率；也優於全程使用固體培養(S-S式培養)之20%莖節萌生率與70%褐化率。若將莖頂培植體培養於含0.01 mg/l TDZ之培養基，再沿用上述三種不同方式進行培養，結果以S-S式及S-L式培養之莖節萌生率分別達到80%及90%，且莖頂組織褐化率僅有20%和10%；優於L-L式培養之40%新莖節萌生率及60% 褐化率。此外，經比較後發現，莖頂培植體接種於含0.01 mg/l TDZ之固體培養基45天後，莖節明顯增長(圖2A)，且將此種培植體再繼代培養於含相同組成份之液體培養基，震盪培養45天後之苗株高度，約與使用含8 mg/l BA＋0.5 mg/l NAA之液體培養基，持續震盪培養105天後所獲得苗株同高，顯示TDZ對促進莖節生長的效果似較使用BA和NAA佳，但前者所培育出的苗株葉色稍淺，而後者葉色較濃綠(圖2B,C)。

表4. 不同培養方式對彩虹鳥蕉新芽莖頂生育之影響

Table 4. Effect of culture method on growth of shoot tip explants of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa

BA	NAA	TDZ	Culture method	Growth of shoot tip explants		Root induction		Browning of shoot tip explants	
	(mg/l)			%	95%CL	%	95%CL	%	95%CL
8	0.5	0	L-L	30	7-65	0	0-31	70	35-93
8	0.5	0	S-L	20	3-56	10	0-45	70	35-93
8	0.5	0	S-L	70	35-93	20	3-56	30	7-65
0	0	0.01	L-L	40	12-74	0	0-31	60	26-88
0	0	0.01	S-S	80	44-97	0	0-31	20	3-56
0	0	0.01	S-L	90	55-100	0	0-31	10	0-45

^Z^L-L：explants were cultured in liquid medium for 45 days and then subcultured in liquid medium for 45 days; S-S explants were cultured on agar-solidifed medium for 45 days and then subcultured on agar-solidifed medium for 45 days; S-L：explants were cultured on solid medium for 45 days and then subcultured in liquid medium for 45 days.

^Y^95 % confidence limits of binomial distribution.

討　論

在植物組織培養研究上常藉由應用無土栽培介質與環境控制之淨化處理或改進消毒與操作技術[5]，甚至使用熱水處理等方法，取得低細菌污染的培植體；此外，也可在培養基內添加各類抗生素或殺菌劑以降低培植體離體培養時各種菌類的污染。例如Arditti等曾報導蝴蝶蘭(*Phalaenopsis*)利用花梗節進行營養繁殖時，於培養基中適量添加50 mg/l gentamycin sulfate或2 g/1 graphite，能有效降低培植體污染[7]。Thomas轉述研究資料認為，在茶樹及山茶花莖頂組織培養過程中，培植體先以1-4 g/1免賴得和10-50 mg/1 rifampicin處理24小時，可有效降低微生物污染並且無毒害作用[23]。Reed等也曾以timentin(500 mg/1或1000 mg/1)配合streptomycin(1000 mg/1)預處理榛子(*Corylus avellana* L.)三個不同品種的莖頂培植體10天，結果僅有10-15%受到細菌污染[21]。此外，培養基中添加60-100 mg/1 cefotaxime抗生素，不但有不錯的抑菌效果，且能適度刺激大麥和小麥培植體的分化與再生[15,16]；本研究表1得結果有顯示，培植體在接種培養前，先以含500 mg/1 cefotaxime抗生素之液體培養基預培養3天，不但對降低細菌污染有顯著效果，且對植物組織無毒害現象。

在組織培養的過程也常於培養基中添加不同種類及濃度的生長調節制，藉以促進培植體生長與分化，現今使用較頻繁者多屬於auxin類(如IAA, NAA, 2,4-D)和cytoknin類(如BA, kinetin)，據Tsay等研

究，上述兩類生長調節劑組成比例，會影響菸草癒合組織分化能力，當auxin含量較高時，有促進癒合組織形成及發根作用；如cytokinin含量較高時，則促進芽體分化與形成[24]。Vuylsteke和Langhe曾在培養基中添加10 μM BA以促進香蕉不定芽莖定分生組織的增殖，但在誘導莖節再生時則建議降低BA含量至1 μM並配合1 μM IAA[26]。Pedersen和Brandt也在研究赫蕉屬植物*Heliconia psittacorum* cv. Choconiana Dwarf新芽莖頂組織之消毒方法時，使用含MS基本鹽類(鐵鹽除外)另添加38 mg/l NaFe-EDTA、2mg/l BA、1 mg/l IAA 、30 g/l蔗糖及3 g/l Gelrite的培養基，結果培植體生育良好[20]。Nathan等則認爲，*Heliconia psittacorum*莖頂組織培養基組成分除MS基本鹽類外，可再添加0.5 mg/l thiamine-HC1、100 mg/l myoinositol、170 mg/l sodiunm hydrogen phosphate、80 mg/l adenine sulphate、30 g/l sucrosc及150 ml/1 coconut water；在進行初代培養時，BA濃度以40 μM時，莖頂組織無發育現象甚至死亡[19]。本研究則發現，培養基中添加4和8 mg/l BA並配合0.5 mg/l NAA，對莖頂培植體新莖節的萌生有促進作用，但BA濃度降爲1和2 mg/l時，則誘導出較多的根系，但需培養3-4個月後培植體才有較明顯的變化。TDZ約在1982年被報導具有類似於cytokinin的活性，可廣泛應用於不同植物種類誘導不定芽、側芽及新莖節的形成且穩定性高，但使用濃度不宜太高，否則易使芽體發育不正常且發根受阻[10,14]。Visser等曾在培養中添加0.2-1 mg/l TDZ，成功誘導天竺葵種子產生體胚[25]。Eapen等認爲不論在培養基中單獨添加TDZ或是配合IAA，對於木豆(*Cajanus cajan* L.)由初生葉片誘導莖節再生，皆有很高的促進效果；如降低TDZ的使用濃度，則能使新莖節快速生長(9)。然而，至今其促進植物組織生長的機制尚未完全明瞭，據推測可能是以類似於N^6-substituted cytokinins的作用模式，直接促進莖節生長；或是先促成植物組織內生cytokinins的合成及累積，在間接促使生長作用加速[8,17]。表3結果顯示，莖頂培植體培養於添加0.01-0.1 mg/l TDZ之液體培養基45天後，有40-50%產生新莖節；如以固體培養基培養，則TDZ含量在0.01-0.5 mg/l時皆有促進莖節萌生的作用，且莖節萌生率皆達八成以上，但此一試驗除觀察到莖節萌生外，並未發現培植體基部產生根系。高[2]曾歸納整理眾多學者研究報告指出，適當濃度的auxin可促進切離根與完整根之生長，而cytokinins能抑制根之生長，尤其是當根生長於黑暗狀況下時作用更明顯，其原因由於降瞭根內auxin含量的緣故，據此推估，TDZ可能因具有類似於cytokinin的作用，因此對於植物組織的作用多在促進側芽或莖節生長，而非誘導根原體的創始分化；如再觀察比較表2和表3培植體的生長情形也發現，培養基添加低濃度TDZ對促進莖頂組織生育的速率雖較添加BA和NAA者快(如圖2B,C)，但在誘導根系分化的效果方面，前者則未必比後者佳。此外，探討以液體培養基進行初代培養所獲得的莖節萌生率比使用固體培養者低，且褐化率偏高，此可能是切取的莖頂部位在初期培養時，體積僅有2-3 mm^3且仍處於幼嫩狀態，震盪培養時易因碰撞受傷導致褐化死亡。

一般對於植物之組織培養研究，多用固體培養或液體培養二種方式，固體培養適合小培植體的分化與再生，且誘導出的癒合組織不易鬆脫，但是培植體產生的代謝物或分泌物蓄積過多，常導致培植體受到毒害或褐化[11]；液體培養則可擴大培植體吸收養份的表面積，並藉由振盪器輔助培養減低生長極性，加速不定芽或芽球體的分化，增進繁殖倍率，例如Hsu等研究指出，*Bupleurum falcatum*頂芽置於含1 mg/l BA的液體培養基中培養30天後，可得到13倍的繁殖效果[12]。但是，液體培養尙需考慮振盪速率，如速率太慢培植體呈浸水狀態，容易導致缺氧死亡；速率太快，則易使幼嫩培植體碰撞受傷；此外，供給充份的氧氣雖能刺激馬鈴薯塊莖芽體快速生長[13]，但對一些植物如*Chrysanthemum*而言，以液體培養的方式易使芽體腫脹並出現玻璃質化的現象。如以固體和液體培養交互培養，常可維持培植體強盛的生長勢[22]。表4結果也顯示，莖頂培植體先以固體培養45天再繼代培養於液體培養基中，不論培養基使用何種生長調節劑，對於新莖節的萌生皆有明顯的增進作用；持續接種於液體培養基者，莖

頂萌生的新莖節生長勢雖較快，但因初期切取的莖頂部位仍處於幼嫩狀態，易受碰撞褐化死亡；而持續以固體培養基培養，不但莖節生長勢較慢且基部易褐化，雖然莖頂尚能存活，但生長速率顯然低於交互培養者。

本研究利用培植體二次消毒及添加適量抗生素的液體培養基浸漬預處理，有效克服培植體高細菌污染率的困擾，也使彩虹鳥蕉莖頂培養得以施行並獲得初步成果，雖然尚有一些如增加種苗繁殖倍率及縮短種苗繁殖所需時間等問題尚待繼續研究，但本試驗結果對未來發展熱帶花卉產業、建立自主性赫蕉健康種苗繁殖技術及進行新花色或新品種誘變選育之遠期目標應有良好助益。

誌　謝

本研究承國科會經費補助(計畫編號：NSC87-2622-B020-001)，文稿英文部份承A. P. Sagare博士撥冗斧正，謹此致謝。

引用文獻

1.李皇照。1996。日本熱帶花卉市場需求遠景。台灣花卉園藝105：54-58。

2.高景輝。1996。植物生長與分化，初版四印。國立編譯館，台灣，台北。335-338頁。

3.陳麗筠。熱帶花卉種類及產銷概況，13-32頁。柯立祥，陳福旗 編。台灣熱帶花卉產業發展研討會專刊，11月28-30日，1994。國立屏東技術學院印。台灣，屏東。

4.薛聰賢。1988。家庭園藝(臺灣的觀賞花木)。農學社，台灣，台北市。第1輯:49頁; 第7輯:26-27頁; 第40輯:25頁。

5.蕭翌柱、許秀惠、王才義、蔡新聲。1998。彩虹鳥蕉組織培養之研究 I.培植體離體培養污染細菌之檢定及防治。中華農業研究47: 346-363。

6.蕭翌柱、王才義、蔡新聲。1999。彩虹鳥蕉組織培養之研究 II.培植體離體培養細菌污染防治之檢討。興大園藝(刊印中)

7.Arditti, J., Johnson, A., and Perera, R. G. 1981. Culture media which do not require sterilization：*Phalaenopsis* flower stalk nodes. Orchid Rev. 89:49-52.

8.Capelle, S. C., Mok, D. W. S., Kirchner, S. C., and Mok, M. C. 1983. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N^6-(2-isopentyl)[8-^{14}C] adenosine in callus tissue of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73:796-802.

9.Eapen, S., Tivarekar, S., and George, L. 1998. Thidiazuron-induced shoot regeneration in pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). Plant Cell, Tissue Organ Culture 53:217-220.

10.Fiola, J. A., Hassan, M. A., Swartz, H. J., Bors, R. H., and McNicols, R. 1990. Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotylendons and leaves. Plant Cell, Tissue Organ Culture 20:223-228.

11.George, E. F. and Sherrington, P. D. 1984. Plant propagation by tissue culture, pp. 125-330. In: George, E. F., and Sherrington, P. D. eds. Handbook and dictionary of commercial laboratories. Eastern Press, Reading, Berks England.

12.Hsu, J. Y., Liu, S. Y. and Tsay, H. S. 1993. Studies on tissue culture of *Bupleurum falcatum* L. cv. Tainung No. 1. Jour. Agric. Res. China 42:245-252.

13.Linus, H. W. and Wagner, M. J. 1986. Effects of oxygen on growth and respiration of potato tuber callus. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 7:217-225.

14.Lu, C. Y. 1993. The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 29:92-96.

15.Mathias, R. J. 1987. Cefotaxime:potential regeneration induction switch. Agricell Rep. 8:11.

16.Mathias, R. J. 1988. Antibiotic stimulates growth and differentiation of barley tissue cultures. Agricell Rep. 10:19.

17.Mok, M. C., and Mok, D. W. S. 1985. The metabolism of [^{14}C]-thidiazuron in callus cultures of *Phaseolus lunatus.* Physiol. Plant 65:427-432.

18.Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiol. Plant 15:473-497.

19.Nathan, M.J., Goh, C. J., and Kumar, P. P. 1992. *In vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* by bud ulture. HortScience :450-

452.

20.Pedersen, C. and Brandt, K. 1992. A method for disinfection of underground rhizome tips of *Alstroemeria* and *Heliconia.* Acta Hort. 325:499-504.

21.Reed, B. M., Mentzer, J., Tanprasert, P. and Yu, X. 1998. Internal bacterial contamination of micropropogated hazelnut : identification and antibiotic treatment. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52:67-70.

22.Robb, S. M. 1957. The culture of excised tissue from bulb scales of *Lilium speciosum* Thun. J. Exp. Bot. 8:348-352.

23.Thomas, R. L. 1987. Control of woody plant culture contaminants. Agricell Rep. 9:38.

24.Tsay, H. S., Gau, T. G. and Chen, C. C. 1989. Rapid clonal propagation of *Pinella ternata* by tissue culture. Plant Cell Rep. 8:450-454.

25.Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R., and Saxena, P. K. 1992. Substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. Plant Physiol. 99:1704-1707.

26.Vuylsteke, D. and De Langhe, E. 1985. Feasibilty of *in vitro* propagation of bananas and plantains. Trop. Agric. (Trinidad) 62:323-328.

Studies on Tissue Culture of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa

III. Effect of Cefotaxime and Plant Growth Regulators on Growth of Shoot Tip Explants *in Vitro*[1]

Yih-Juh Shiau[2], Tsai-Yih Wang[3], and Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

This paper describes a method of *in vitro* propagation of *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa by using terminal shoot tip explants. Various concentrations (25,50,100 and 500 mg/l) of cefotaxime were used in liquid Murashige and Skoog (MS) basal medium to control contamination. Lower rate of contamination was observed in shoot tip explants after pretreatment of explants in liquid MS medium supplemented with 500 mg/l cefotaxime for 3 days. Well developed shoots were successfully obtained after 45 days of culture of shoot tip explants on MS medium supplemented with 4-8 mg/l Benzylaminopurine (BA) and 0.5 mg/l α-Naphthaleneacetic acid (NAA). Addition of 0.01-0.5 mg/l Thidiazuron (TDZ) in the medium was found to be beneficial for rapid growth of shoot tip explants. The effect of various culture methods on growth of shoot tip explants was also studied.

Key words： Cefotaxime, Thidiazuron, *Heliconia psittacorum* cv. Rhizomatosa, *In vitro* culture.

1. Contribution No. 1999 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture. This paper is a part of Master thesis of the first author.
2. Respectively Research assistant, Senior agronomist, Department of Agronomy, TARI, Wufeng, Taichung , Taiwan, ROC.
3. Associate professor, Department of Horticulture, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 52～63(1999)

以逢機增殖多型性DNA(RAPD)進行火鶴花栽培種鑑定與遺傳歧異性之分析[1]

王昭月[2] 莊耿彰[3] 范明仁[2]

摘要：本研究以農業試驗所『火鶴花育種計畫』中收集的15個栽培種爲材料，探討利用逢機增殖多型性DNA(randomly amplified polymorphic DNA；RAPD)分子技術作爲品種鑑定及遺傳歧異性分析。試驗結果顯示，自8條含有10個核甘酸的逢機引子經聚合酵素連鎖反應(polymerase chain reaction；PCR)產物中，有24個特定的DNA多型性標誌片段，可用以鑑別出14個栽培種。進一步以此8個多型性表現高的引子，將其PCR反應產物160個RAPD片段，合併進行UPGMA(unweighted pair-group mean arithmetic)群集分析，結果獲得三個主要群組。第一群包含8個栽培種，其佛燄苞顏色(花色)主要爲紅色系。第二群爲6個栽培種組成，主要爲源自夏威夷育成之品種。而第一、二兩群14個栽培種均屬*Anthurium andraeanum*。第三群則僅有一個獨立的栽培種 "Southern Blush" ，爲*A. andraeanum* X *A. amnicola*之種間雜交種。試驗結果顯示，利用RAPD兼具有鑑別火鶴花栽培種之能力，亦可用以估測品種間基因型之遺傳相似性，此對於未來藉以選拔遺傳歧異高的雜交親本及新雜交組合的獲得，將有所助益。整體而言，RAPD分析技術對於加速火鶴花育種效率，應具有實用價值。

關鍵詞：火鶴花、育種、逢機增殖多型性 DNA、鑑定、遺傳歧異性。

前 言

根據台灣農業年報(1996、1997年)[1,2]，火鶴花爲本省十大經濟切花之一，原產於中南美洲熱帶地區，性喜高溫多濕，適合台灣氣候栽培。火鶴花屬(*Anthurium*)包含"種"(species)數多達1000個(Kamemoto,1996)[18]。依植物分類(如植株形態、花形等)通常區分成18 個sections，其中Calomystrium section內的 *A. andraeanum* 是全球主要經濟栽培之切花用種原，其特性爲肉穗黃至白，花型爲中至大花，花梗直立且長，花型華麗對稱，花色多(有紅、粉紅、橙、白、綠色，以及混合不同顏色的雙色系)；另外Porphyrochitonium section(如：*A. amnicola*)爲重要之盆花種原,具明顯多花性[18]。農試所爲開發自有品種，自1989年起著手進行引種及雜交育種工作，除上述兩個主要『種』以外，並逐年自國內外引進新興優良品種，合計目前收集品種數達90個以上，皆提供作爲雜交育種用親本。火鶴花育種工作執行迄今，已完成近200個雜交組合，有三萬多株雜交後裔，並自1996年起進行雜交後代之單株選拔。火鶴花自播種至開花，約須18個月之生長期，傳統田間調查選拔較爲耗時費工，而自1996至2000

1. 行政院農業委員會農業試驗所 研究報告第2000號。
2. 本所作物種原室助理研究員、研究員兼主任。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。
3. 本所園藝系助理研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

年間，農試所的雜交後裔開花株將達數萬株以上，屆時開花特性調查及優良單株選拔工作，勢必非常龐大且繁重。

近二十年來，由於分子生物鑑定技術蓬勃發展，已成爲輔助育種選拔或品種鑑定上快速而有效的工具之一。其中最常利用的有蛋白質層次的同功異構酵素(isozyme)[19]；DNA層次的RFLP(restriction fragment length polymorphism)[28]、RAPD(random amplified polymorphic DNA)[3,8,26]，以及新近發展中的SSR(simple sequence repeat)[6,30]與AFLP(amplification fragment length polymorphism)等。唯同功異構酵素受限於可供標誌基因座較少，不若DNA分子層次分析之多型性高且穩定。故自Kary Mullis(1984)提出PCR(polymerase chain reaction)技術後，利用DNA層次的分子生物標誌，已廣泛被利用於種原(品種)鑑定或植物育種後裔遺傳之評估[12]；另外對於種原演進，遺傳相似性等探討也視爲一項有效的工具之一。分子生物標誌較傳統之植物性狀更具準確與快速性[23]。1990年Welsh[32]及William[33]更提出操作簡單的RAPD分析技術，由於可免除早期RFLP分析須高度技術性的操作與昂貴的分析成本，故於提出後短短十年間，已成爲作物遺傳分析最簡便而有效的分子生物標誌之一，在小麥[5,29]、十字花科蔬菜[6,20,21]、豆類[4]、根莖作物(馬鈴薯[10]、芋[17]、甘藷[27])、木本果樹(柑橘[7]、梨[25]、酪梨[13]、杏仁[3])、香蕉[14]、草莓[9]、花卉作物(菊花[34]、康乃馨[28]、虎頭蘭*Cymbidium*[24])等，均有利用RAPD進行種原鑑別或特定基因分析之研究報導。RAPD分析對於多年生或幼年性長之果樹類或蘭花，作爲品種鑑定及遺傳親緣關係探討，尤具有縮短時效之效益。本試驗材料火鶴花係屬多年生宿根花卉，自播種至開花評估，動輒費時二～三年，故本研究擬利用 RAPD分子生物鑑定技術，建立親本(栽培種)鑑別圖譜，並探討親本間之遺傳歧異性，俾提供未來雜交育種親本與後裔選拔之參考。

材料與方法

一、植物材料

自農業試驗所園藝系『火鶴花育種』計畫中，選取雜交用親本15個栽培種，其中包含目前主要的紅花栽培種" Tropical "、粉紅色"Lunette"、橙色"Nette"及雙色系"Paradiso"等；另外包含一個收集自本省苗圃，品種名稱不詳的小紅花品種 "P001"(表1)。供試驗用植株均爲二年生以上之成熟開花株。

二、DNA萃取

DNA 萃取方法參考Murray(1980)[22]及Doyle(1990)[11]，取植株嫩葉0.4公克加入液態氮磨碎，加入500 μl 的 DNA 萃取緩衝液(2%(w/v) CTAB，100 mM Tris-HCl ，pH 8.0; 20 mM EDTA ；1.4 M NaCl ; 0.2%(v/v) β-mercaptoethenol)，再放入 60℃水浴 30 分鐘，輕輕混勻後加入500 μl chloroform-isomamyl alcohol (24：1 , v/v) ，混合均勻，在 4℃ 以14,000rpm 離心10 分鐘。取上清液加入 500 μl之冰冷 isopropanol，混合均勻後放置在室溫下沉澱 1~2 小時(或 -20℃，隔夜)。再離心去上清液，再加入1 ml的 washing buffer(76% ethanol(v/v); 10 mM ammonium acetate)輕輕混勻後，再於 4℃ 下以 14,000 rpm 離心 10 分鐘，再去上清液將沉澱的 DNA 置於冷凍乾燥機吹乾。將凍乾之 DNA 沉澱 溶於 50 μl 的無菌水，再加入 RNase (10 μg/ml) 在 37℃ 下反應 20 分鐘。最後取 10 μl 的 DNA 溶液，稀釋 100 倍並測定 OD 260 nm 之讀值，及計算 DNA 含量濃度。

三、聚合酵素連鎖反應(Polymerase Chain Reaction，PCR)

將萃取得之 genomic DNA 稀釋成 5 ng/ μl 放置在 -20℃ 下，提供聚合酵素連鎖反應時，作爲模板DNA。自Operon Kit(B、C、F、G、J) 共100種引子，進行15個栽培種之聚合酵素連鎖反應。反應液總

體積為 25 μl，內含 1 u Taq polymerase(Promega)、1×PCR buffer(50 mM KCl；10 mM Tris-HCl，pH 9.0；0.1% Triton 100)、2.0 mM MgCl2、200 μM dNTP、0.2 μM primer 及 50 ng template DNA。聚合酵素連鎖反應儀器為 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler 960，反應溫度條件設定如下： 94℃ 3 分鐘，40℃ 1 分鐘，72℃ 1 分鐘；再進行43 次的94℃ 1 分鐘，40℃ 1 分鐘，72℃ 2 分鐘；最後72℃ 5 分鐘。反應完成後貯藏在 4℃。

表1. 進行RAPD之火鶴花栽培種

Table 1. 15 Cultivars and characters of *Anthurium* used in RAPD analysis

No.	Cultivars	Spathe Color	Spadix color	Stem color	Origin
1	Lydia	Pink	Pink	Red	AVO(Netherlands)
2	Lunette	Light -pink	Pink	Red	Flamingo(Netherlands)
3	Tropical	Red	Yellow-green	Green	Anthura (Netherlands)
4	Alexis	Red	Green	Green	AVO(Netherlands)
5	Fla-Success	Red	Yellow	Green	Flamingo(Netherlands)
6	Fuego	Red	Yellow	Green	AVO(Netherlands)
7	Inka	Deep Red	Yellow	Red	? (Netherlands)
8	Obake	Red/green	Yellow	Green	?(Hawaii)
9	Nette	Orange	Yellow	Re	AVO(Hawaii)
10	Fla-Exotic	White with red border	Yellow	Red	Flamingo(Netherlands)
11	Paradiso	Pink/green	Pink	Green	Anthura (Netherlands)
12	Southern Blush	Pink lavender	Lavender-brown	Red	Henny(Florida)
13	Evergreen	White/green	Red	Green	Anthura (Netherlands)
14	Asahi	White with red vein and border	Red-orange	Red	(Hawaii)
15	P001	Red	Yellow	Green	Unknown

四、DNA電泳

經聚合酵素連鎖反應而增殖之DNA ，取 12 μl 加入 6 倍的電泳緩衝液(6×loading buffer：0.25% bromophenol blue 及 xylene cyanol，40% w/v sucrose)，而RAPD分析係在 2.5% 的 agarose 以 TAE buffer (40 mM Tris acetate，pH 8.0；1 mM EDTA)進行 DNA 電泳；電泳槽為Cosmo, Mupid-2，電壓100 伏特，電泳時間約 25 分鐘，結束後置於 0.5 mg/ml 的 ethidium bromide 中染色 20-30 分鐘，再置於 UV 光箱中，檢視膠體上 DNA 多型性片段，並照相及貯存影像於 IS 2000 Digital Imaging System(Alpha Innotech Corporation) 進行分析。

五、資料分析

群集分析是採用 Gel-Compar 軟體，計算兩品系間所有分析的 RAPD條帶中相同條帶的比率。所有樣品兩兩分析後，以 UPGMA(unweighted pair-grouping mean arithmetical)估算相似性程度。PCR 產

物的 DNA 片段係以 Bio100 DNA Ladder(3000bp~100bp) 作爲估算分子量。並以 Jaccard's 相似性係數分析，相似性係數值(simple matching coefficient)的計算方式爲F = nxy/(nx+ny) - nxy。nx及ny分別代表X及Y品系的所有多型性 DNA 片段，nxy則表示X及Y品系間都共有的片段數，再於個人電腦中以 Gel-Compar 軟體進行 UPGMA 群體分析，估算品系間遺傳相似程度(similarity coefficient)。

結　果

自Operon 逢機引子組(random primer Kit B、C、F、G、J)共100個引子經PCR 反應，篩選出產物DNA多型性高的計8個引子：OP-B04(圖1-A)、OP-B17(圖1-B)、OP-C08(圖1-C)、OP-F06(圖1-D)、OP-F12(圖2-A)、OP-F16(圖2-B)、OP-G18(圖2-C)及OP-J14(圖2-D)。綜合此8個引子經PCR反應之所有產物，合計可產生160個RAPD片段，其中159個片段具多型性，反應產物表現多型性之比率爲99％，而平均每個引子反應可產生20個RAPD 片段，其分子量大小介於226bp至3,076bp(表2)。

一、火鶴花栽培種鑑定與 RAPD markers：

以多型性表現高的8個引子，分別篩選利用於栽培種鑑定之特定標誌片段。結果顯示，供試的15個栽培種除"Asahi"外，14個栽培種均可獲得鑑別用之特定標誌片段(RAPD marker)，總計篩選得24個RAPD markers(表2、表3)。而8個引子中，除OP-F12可產生7個特定標誌片段外，其餘每個引子可產生2~3個標誌片段(表2)。

表2. 火鶴花RAPD分析中具多型性之引子及其多型性特性
Table 2. Characteristics of polymorphic RAPD primer in *Anthurium*

Primers	Sequence	Product Size (bp)	No. of Fragments	Polymorphic Fragments	Specific Fragments for Identification
OP-B04	5'-GGACTGGAGT -3'	2,928~292	23	22	2
OP-B17	5'-AGGGAACGAG-3'	2,777~355	22	22	3
OP-C08	5'-TGGACCGGTG-3'	1,183~350	12	12	3
OP-F06	5'-GGGAATTCGG-3'	1,964~448	19	19	2
OP-F12	5'-ACGGTACCAG-3'	2,835~355	25	25	7
OP-F16	5'-GGAGTACTGG-3'	3,076~262	32	32	3
OP-G18	5'-GGCTCATGTG-3'	1,266~226	17	17	2
OP-J14	5'-CACCCGGATG-3'	2,621~406	10	10	2
Total bands			160	159	24
Average			20	19	

引子OP-G18反應產物中1,161bp片段，僅出現在 "Lydia"栽培種存在，具有標識之效。而"Lunette"栽培種則可由OP-G18反應產物中另一個226bp片段標識之。"Tropical"栽培種特有標誌片段有三個，分別是OP-B17產物中414bp片段、OP-C08 PCR產物中455bp片段，及OP-F16反應產物中262bp片段。"Alexis"栽培種可以OP-F12反應產物中690bp片段標誌。"Fla-Success"栽培種可以OP-B04反應產物中374bp片段標識。"Fuego"栽培種亦有二個可標誌片段，分別爲OPC08產物中1790bp片段，及OP-F16反應產物中278bp片段。"Inka"栽培種則以OP-F12反應產物中401bp片段，可以標識出。"Obake"栽培種以OP-F12反應產物中426bp片段標識之。"Nette"栽培種具有三個標識片段，分別爲OP-C08反應產物中483 bp片段，OP-F12反應產物中532bp片段，及OP-F16反應產物中421bp片段。"Fla-Exotic"栽培種可由

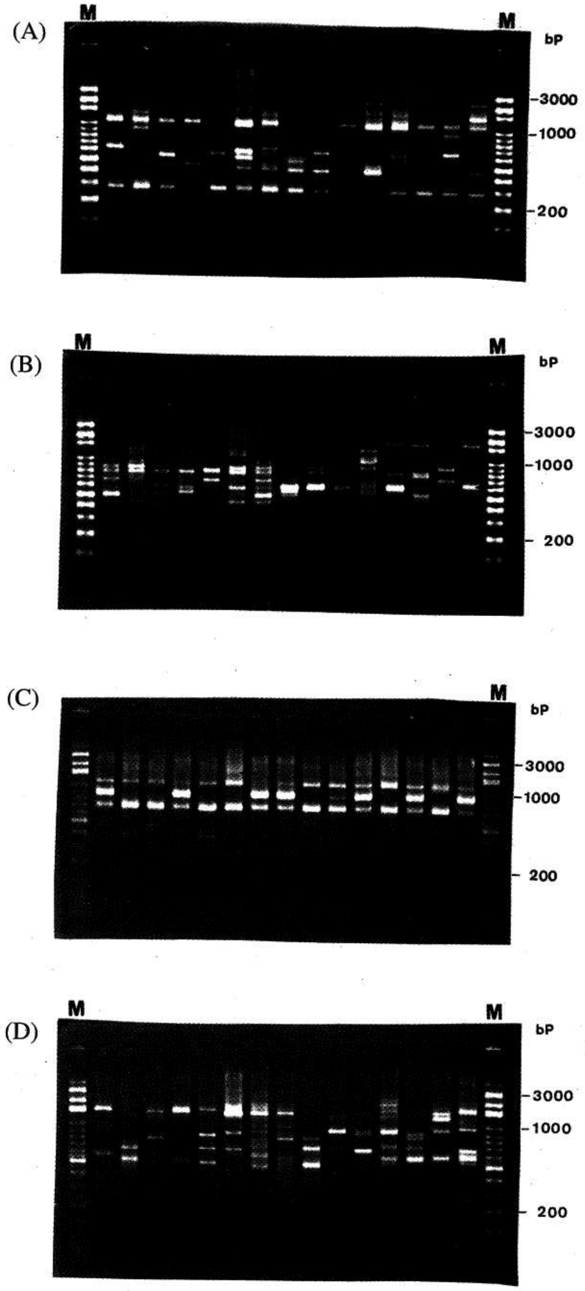


圖1. 火鶴花15栽培種(詳見表1) 之RAPD圖譜

Fig.1. RAPD profiles generated by 4 primers (A：OP-B04、B：OP-B17、C：OP-C08、D：OP-F06) and resolved by 2.5% agarose gel. Lane 1 and 17: molecular marker (Bio100 DNA Ladder). Lane2~16:cultivars tested as Table1.

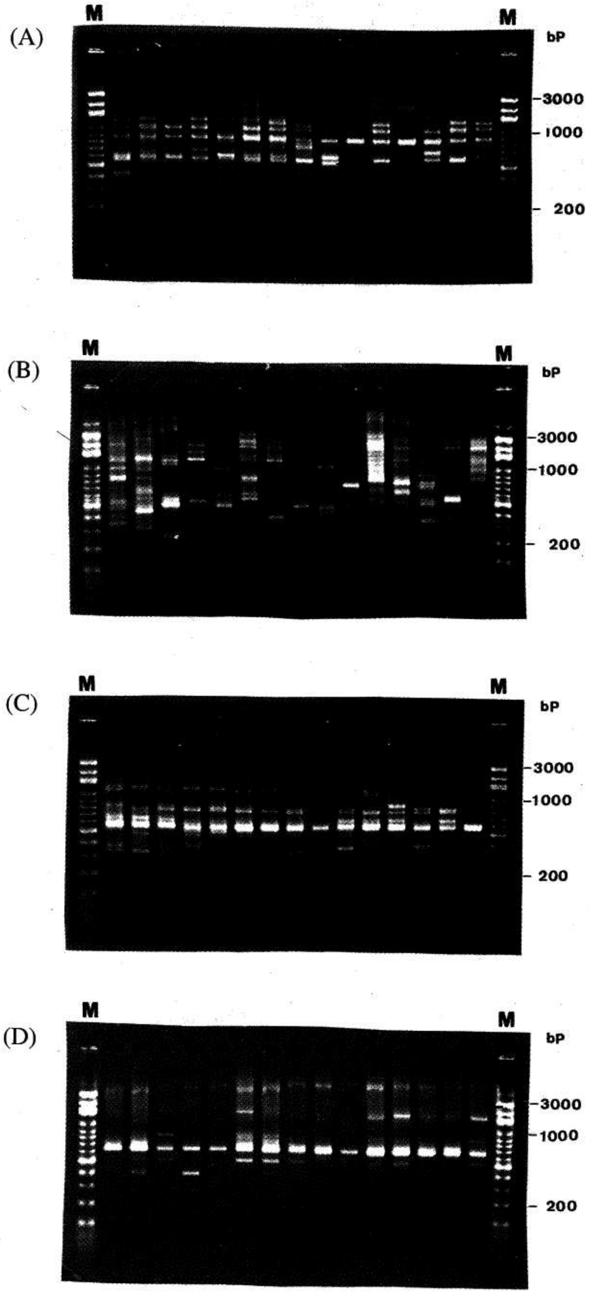


圖2. 火鶴花15栽培種(詳見表1) 之RAPD圖譜

Fig. 2. RAPD profiles generated by 4 primers (A：OP-F12、B：OP-F16 、C：OP-G18、D：OP-J14) and resolved by 2.5% agarose gel. Lane 1 and 17: molecular marker (Bio100 DNA Ladder). Lane2~16:cultivars tested as Table1.

OP-J14反應產物中1,014bp片段標識。"Paradiso"栽培種具有二個標識片段，其一爲OP-B17反應產物中1,378bp片段，另一標誌爲OP-F12反應產物中2,790bp片段。種間雜交種"Southern Blush"具有二個標誌片段，分別爲OP-F06反應產物中1,964bp片段，及OP-F12反應產物中448bp片段。"Evergreen"栽培種有二個標誌片段，分別爲OP-B04產物中764bp片段，及OP-F12反應產物中1,544bp片段。小紅花"P001"也有二個標誌片段，分別爲OP-F06反應產物中1,964bp片段，及OP-F12反應產物中448bp片段(表3)。

表3. 火鶴花各栽培種鑑定之特定RAPD標誌片段

Table 3. Specific RAPD markers within 15 cultivars of *Athurium*

Cultivars	Primers (specific fragment)
Lydia	OP-G18(1,161 bp)
Lunette	OP-G18(226 bp)
Tropical	OP-B17(414 bp)、OP-C08(455 bp)、OP-F16 (262bp)
Alexis	OP-F12(690bp)
Fla-Success	OP-B04(374 bp)
Fuego	OP-C08(1,790bp) 、OP-F16(278 bp)
Inka	OP-F12(401 bp)
Obake	OP-F12(426 bp)
Nette	OP-C08(483bp) 、OP-F12(532 bp)、OP-F16(421 bp)
Fla-Txotic	OP-J14(1,014 bp)
Paradiso	OP-B17(1,378 bp)、OP-F12(2,790 bp)
Southern Blush	OP-F06(1,964 bp) 、OP-F12(448 bp)
Evergreen	OP-B04(764 bp) 、OP-F12(1,544 bp)
P001	OP-B17(626 bp)、OP-F06(1,138 bp) 、OP-J14(2,621 bp)

二、火鶴花栽培種間遺傳歧異性之分析

將8個引子PCR反應之所有多型性DNA片段，合併以Jaccard's相似性係數(similarity coeffient)[5]構築相似性矩陣(similarity matrix)，並進行UPGMA群集分析。結果供試的15個栽培種間，相似性最高爲"Tropical"與"Fuego"，其相似性係數爲0.73。相對地，"Southern Blush"與其餘14個栽培種間相似性係數最低，相似性係數爲0.4~0.52(表4)。由遺傳相似性之群集樹狀圖結果顯示，15個栽培種主要可分成三群：第一群包含8個栽培種("Tropical"、"Fuego"、"Lunette"、"Alexis"、"P001"、"Inka"、"Evergreen"、"Paradiso")，群集遺傳相似性係數爲0.53，其中均爲紅花系之"Tropical"與"Fuego"相似性係數最高爲0.73，其次爲同屬紅花系之"Alexis"與"P001"，相似性係數爲0.67。基本上，同爲紅花系的栽培種間遺傳相似性較近，在樹狀圖有相依及群集的趨勢(圖3)，另外本群栽培種除"P001"、"Inka"品種來源不明外，其餘育種來源均爲荷蘭。第二群包含6個栽培種("Fla-Success"、"Nette"、"Lydia"、"Asahi"、"Obake"、"Fla-Exotic")，群集遺傳相似性係數爲0.54，其中紅花系栽培種"Fla-Success"或橘紅色"Nette"

表4. 火鶴花15個栽培種之RAPD markers以Jaccard's 計算之相似性矩陣

Table 4. Similarity matrix for Jaccard's coefficient among 15 cultivars of *Anthurium*

Cultivar	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Lydia	1	1.00														
Lunette	2	0.57	1.00													
Tropical	3	0.58	0.60	1.00												
Alexis	4	0.55	0.57	0.51	1.00											
Fla-Success	5	0.61	0.57	0.61	0.61	1.00										
Fuego	6	0.52	0.55	0.73	0.59	0.51	1.00									
Inka	7	0.53	0.56	0.63	0.64	0.56	0.64	1.00								
Obake	8	0.54	0.44	0.50	0.58	0.65	0.48	0.56	1.00							
Nette	9	0.48	0.44	0.55	0.51	0.58	0.49	0.43	0.46	1.00						
Fla-Exotic	10	0.58	0.47	0.61	0.50	0.49	0.55	0.52	0.66	0.54	1.00					
Paradiso	11	0.43	0.46	0.52	0.58	0.45	0.59	0.46	0.42	0.37	0.45	1.00				
S.Bz	12	0.46	0.46	0.49	0.52	0.48	0.50	0.40	0.41	0.45	0.48	0.50	1.00			
Evergreen	13	0.59	0.58	0.46	0.63	0.55	0.47	0.54	0.51	0.53	0.51	0.53	0.60	1.00		
Asahi	14	0.65	0.52	0.52	0.53	0.55	0.57	0.51	0.60	0.53	0.65	0.41	0.50	0.54	1.00	
P001	15	0.57	0.50	0.50	0.67	0.49	0.60	0.65	0.56	0.47	0.60	0.60	0.51	0.64	0.55	1.00[Y]

[Z] Cultivar S.B.：\"Southern Blush\"

[Y] Range of value from 0 to 1.00 , values closer to 1.00 indicating increasing similarity

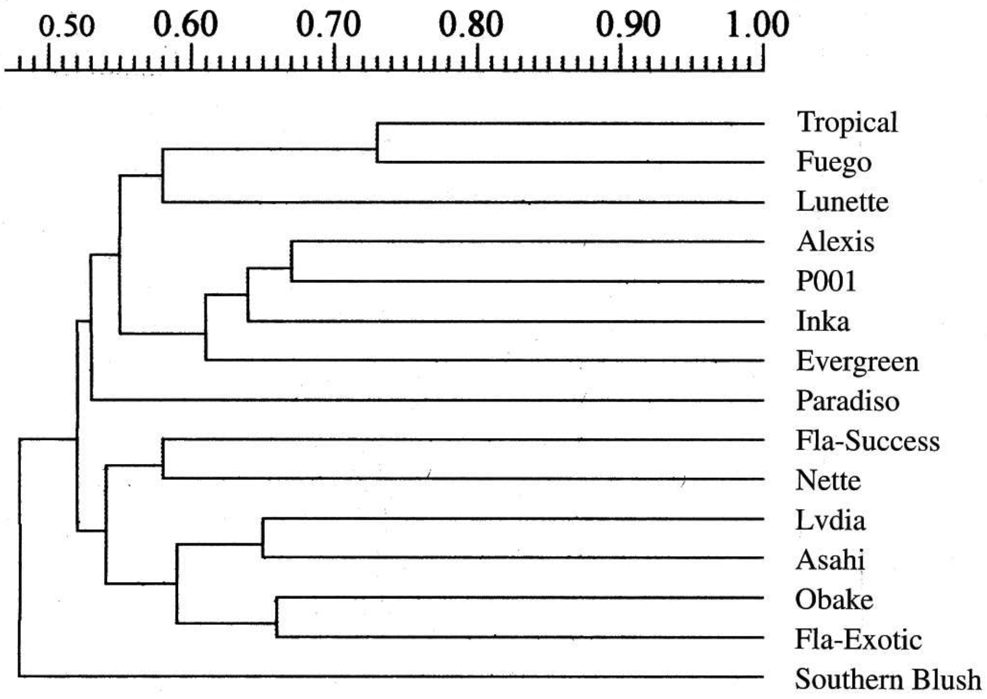


圖3. 火鶴花15個栽培種之RAPD圖譜，經UPGMA Jaccard's計算之相似性樹狀圖

Fig. 3. Dendrogram illustrating genetic relationship among 15 cultivars of *Anthurium*, geneated, by UPGMA cluster annlysis calculated from 160 RAPD markers produced by eight primers. The scale on the top is Jaccard's coefficent of sumularity

栽培種，皆明顯相異於其他粉、白色系之栽培種，而相異性大的這兩個栽培種間之遺傳相似性係數僅0.58(圖3)；另外源自夏威夷育成之栽培種"Nette"、 "Asahi"、 "Obake"則均同位於第二群中。第三群則僅有一個獨立的栽培種"Sourthern Brush" ，此為*A. andraenum* X *A. amnicola*之種間雜交種，是由美國-佛羅里達大學所育成之栽培種[15,16]。綜合15個栽培種間之遺傳相似性係數為0.48。

討 論

就多年生營養繁殖型作物而言，以傳統植物性狀作為品種鑑別或遺傳基因型分析時，易受環境影響性狀表現，且必然面臨較冗長的評估時間與人力花費，此對於育種工作也是導致延緩時效的原因之一。有鑑於此，Kobayashi(1987)等人，曾著手研究以同功異構酵素鑑定栽培種[19]，期望藉由生化技術，以快速正確地達到種原鑑定目的，並加速品種評估之效率。唯試驗結果顯示，測定的酵素除"過氧化酵素"(peroxidase, PRX)圖譜表現較穩定外；其餘在品種間具多型性之MDH(malate dehydrogenase)、PGI(phosphoglucose isomerase)等酵素活性，表現似乎不穩定，且分析之酵素圖譜也未能完全清晰辨識[19]。嗣後，以分子生物標誌進行火鶴花種原鑑定及遺傳分析，未見進一步具體提出。推測可能如Kobayashi提出的說明，也受限於火鶴花葉片存在大量多酚類聚合物，影響酵素等分子萃取之品質。而本研究中，亦同樣發現由葉片萃取之DNA產量偏低，DNA純度不好，大部分的品系均須重複萃取，才能取得提供PCR反應用之DNA(OD260/OD280=1.7~2.0)。故針對未來如擬以PCR分析技術進行火鶴花大量後裔選拔，其分析用之DNA萃取技術，仍有待進一步研究改進。

Wannakrairoj及Kamemoto(1990)[31]在火鶴花之花色遺傳育種研究上，指出火鶴花主要的五個花色(紅、粉紅、橘紅、珊瑚粉、白色)，係由二個花青素cyanidin 3-rutinoside(cyanidin 3-rhamnosylglucoside) 及pelagonidin 3-rutinoside(pelagonidin 3-rhamnosylglucoside)的濃度和比值所決定。而這二個花青素則分別由二個主效基因所控制，其中M基因控制cyanidin 3-rutinoside的生合成；O基因控制pelagonidin 3-rutinoside的生合成。唯調控基因-P基因，具有調控M基因與O基因表現之作用。在P基因為顯性時：基因型 "M-O-"花色表現為紅花系，其中包含佛焰苞顏色為紅色或粉紅色者；而基因型"mm-O-"花色表現為橘紅色系，其中包含佛焰苞顏色為橘紅色或珊瑚粉色者。隱性基因oo對M基因呈上位性，基因型"-oo"花色表現為白色。在pp隱性基因下：M-O-pp基因型花色表現為紫色。前人有關花色基因之研究，與本試驗中以RAPD分析15個栽培種間之遺傳關係時，所發現同紅花色或同育種地區的品種，其遺傳相似性係數較高，在樹狀圖的關係位置相近且有群聚的趨勢符合。鑑於花色為火鶴花育種選拔一項重要性狀，及已知控制花色為三對主效基因之表現，未來應可考慮選用更多不同花色族群，以較大量的樣品材料，探討利用RAPD或其他相關之PCR分析技術，進行花色基因之標誌，以提供育種選拔之參考。

引用文獻

1. 台灣農業年報。1996。385頁。台灣省政府農林廳。
2. 台灣農業年報。1997。403頁。台灣省政府農林廳。
3. Bartolozzi F., M. L. Warburton, S. Arulsekar , and T. M. Gradziel. 1998. Genetic characterization and relatedness among California almond cultivars and breeding lines detected by randomly amplified lymorphicDNA (RAPD) analysis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(3):381-387.
4. Briand L. , A. E. Brown , J. M. Lenne, and D. M. Teverson. 1998. Randomly amplified polymorphic DNA variation within and among bean landrace mixtures (*Phaseolus vulgaris* L.) from Tanzania. Euphytica 102:371-377.
5. Cao, W. , P. Hucl , G. Scoles, and R. N. Chibbar. 1998. Genetic diversity within apelta and macha wheats based on RAPD analysis. Euphytica 104:181-189.

6. Charterers, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson, and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars *Brassica napus* L. ssp. oleifera) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theor. Appl. Genet. 92:442-447.
7. Coletta Filho, H. D., M. A. Machado , M.L.P.N. Targon, M.C. P.Q.D.G. Moreira , and J.Pompeu Jr. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica 102:133-139.
8. De Bustos, A. , C. Casanova , C. Soler , and N. Jouve. 1998. RAPD variation in wild population of four species of the genus *Hordeum* (Poaceae). Theor Appl Genet. 96:101-111.
9. Degani, C. , L. J. Rowland , A. Levi , J. A. Hortynski , and G. J. Galletta. 1998. DNA fingerprinting of strawberry (*Fragaria ananassa*) cultivars using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 102:247-253.
10. Demoke, T., D. R. Lynch, L.M. Kawchuk, G. C. Kozub, and J. D. Armstrong. 1996. Genetic diversity of potato determined by random amplified polymorphic DNA analysis. Plant Cell Rep. 15:662-667.
11. Doyle, J.J., and J.L.Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
12. Erlich, H. A. . 1989. PCR technology. pp 246. Stockton Press. New York.
13. Fielder, J. , G. Bufler , and F. Bamgerth. 1998. Genetic relationships of avocado (*Persea americana* Mill.) using RAPD markers. Euphytica 101:249-255.
14. Grajal-Martin, M. J. , G. Siverio-Grillo , and A. Marrero-Dominguez. 1998. The use of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the study of genetic diversity and somaclonal variation in *Musa* . Acta Hort. 490:445-454.
15. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. "Southern Blush" A hybrid *Anthurium* for floiage producers. Circular, Agriculture Experiment Station, No.S-350 . pp.4. University of Florida.
16. Henny, R. J., R.T. Poole, and C.A. Connover. 1988. "Southern Blush" *Anthurium* . Hortscience. 23(5)：922-923.
17. Irwin, S.V. , P. Kaufusi ,K. Banks , R. de la Pena , and J.J. Cho. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. Euphytica 99:183-189.
18. Kamemoto, H. and A. R. Kuehnle. 1996. Breeding Anthuriums in Hawaii. pp.132. University of Hawaii Press.19. Kobayashi R. S. , J. L. Brewbaker , and H. Kamemoto. 1987. Identification of *Anthurium andraeanum* cultivars by gel electrophoresis. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 112(1) : 164-167.
20. Kresovich, S., J. G. K. Williams, J. R. McFerson, E. J. Routman, and B. A. Schaal. 1992. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay. Theor. Appl. Genet. 85:190-196.
21. Mailer, R. J., R. Scarth, and B. Fristensky. 1994. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. Theor. Appl. Genet. 87: 697-704.
22. Murray, M.G., and W.F. Tompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl.Acid Res. 8: 4321-4325.
23. Nicese, F.R. , J.I. Hormaza , and G.H. McGranahan. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotype based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206.
24. Obara-Okeyo, P. , and S. Kako. 1998. Genetic diversity and identification of *Cymbidium* cultivars as measured by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Euphytica 99:95-101.
25. Oliveira, C.M. , M. Mota , L. Monte-Corvo , L. Goulao , and D.M. Silva. 1999. Molecular typing of Pyrus based on RAPD markers. Sci. Hort. 79:163-174.
26. Ruas, P. M. , A. Bonifacio , C. F. Ruas , D. J. Fairbanks , and W. R. Andersen. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by random amplified polymorphic DNA fragments (RAPD). Euphytica 105:25-32.
27. Sagredo, B. , P. Hinrichsen , H. Lopez ,A. Cubillos , and C. Munoz. 1998. Genetic variation of sweet potatoes (*Ipomoea batatas* L.) cultivated in Chile determined by RAPDs. Euphytica 101:193-198.
28. Scovel, G., H. Ben-Meir, M. Ocadis, H. Itzhaki, and A. Vainsein. 1998. RAPD and RFLP markers tightly linked to the locus controlling carnation (*Dianthus caryophyllus*) flower type. Theor. Appl. Genet. 96:117-122.
29. Sun, Q. , Z. Ni , Z. Liu , J. Gao , and T. Huang. 1998. Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99:205-211.
30. Wang, Z., J.L. Weber, G. Zhong, and S.D. Tanksley. 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. Theor. Appl. Genet. 88:1-6.

31. Wannakrairoj, S. and H. Kamemoto. 1990. Inheritance of purple spathe in *Anthurium*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 115(1) :169-171.

32. Welsh, J. and M. McClelland. 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primer PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. Nucleic Acids Res. 19: 5275-5279.

33. Williams, J. G., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18:6531-6535.

34. Wollf, K., E. Zeitkiewicz, and H. Hofstra. 1995. Identification of *chrysanthemum* cultivars and stability of DNA fingerprint patterns. Theor. Appl. Genet. 91:439-447.

Randomly Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Markers for Identification and Genetic Diversity Analysis of *Anthurium* Cultivars[1]

Jau -Yueh Wang [2] Keng-Chang Chuang[3] and Ming- Jen Fan[2]

Summary

Fifteen *Anthurium* cultivars collected for the breeding program of Taiwan Agriculture Research Institute were evaluated by randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) technique. Objectives were to assess genetic diversity within the cultivars and survey the identification markers. Twenty-four DNA fragments derived from eight primers are polymorphic and can be used to distinguish the fourteen cultivars. A dendrogram generated by UPGMA(Un-weighted Pair-group Mean Arithmetic) cluster analysis from 160 RAPD fragments that all amplified by eight primers, divided the fifteen cultivars onto three main groups. The first group comprised eight cultivars, all with red spathe. The second group comprised six cultivars that mainly original derived from the breeder of Hawaii. The fourteen cultivars within these two groups, belonging to *Anthurium andraeanum*, while only with one culivar "Southern Blush" in the third group, is a hybrid from *A. andraeanum* X *A. amnicola.* The results suggest that RAPD markers are useful in current breeding program of *Anthurium*, and allowing the identification within different cultivars as well as the estimation the genetic similarity among genotypes, which will be valuable in selecting the best parents and to obtain new combinations.

Key words： *Anthurium* , Breeding, Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD), Identification, Genetic diversity

---

1. Contribution No. 2000 from Taiwan Agriculture Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectitvely , Assistant Agronomist, Research Fellow and Head, Crop Genetic Resources Laboratory, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

3. Assistant Horticulturist , Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 64～70 (1999)

泥炭苔對叢枝菌根菌繁殖之影響[1]

莊明富 程永雄[2]

摘要：叢枝菌根菌*Glomus mosseae*的繁殖一般採用河砂為栽培介質，是因河砂具有高透氣性與低肥份的特性，但缺點是保水性差及不具緩衝性，泥炭苔則具有高保水性的優點，因此本試驗目的是探討河砂中添加泥炭苔，提高叢枝菌根菌在宿主根系的繁殖效果。試驗首先將泥炭苔(10%)添加方式分成混合或覆蓋兩種處理，供試宿主植物有百喜草、營多藤、玉米及甘藷等四種，結果除甘藷外，菌根形成率與孢子濃度都以混合處理者高於覆蓋處理者。將河砂混合1/5, 1/3, 1/2(體積/體積)的泥炭苔，或單獨使用河砂，探討對*G. mosseae*在百喜草根圈土繁殖之影響，結果顯示盆缽中完全為河砂者，菌根形成率與厚膜孢子數最高，隨著泥炭苔混合比例增加，菌根形成率與厚膜孢子數逐漸減低。泥炭苔採用覆蓋方式，定期調查*G. mosseae*在玉米根圈土的繁殖，顯示隨接種時間增加，菌根形成率與孢子數逐漸提高，至接種後第11週達到高峰，而後逐漸降低。由以上結果，顯示單獨以河砂為介質，所生產的孢子數最高，添加泥炭苔反而不利於菌根形成與孢子的產生，其可能的原因有待進一步探討。

關鍵詞：泥炭苔、盆缽繁殖法、叢枝菌根菌

前　　言

叢枝菌根菌(*Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe)是一種與植物共生的有益眞菌，當其感染宿主植物根系形成內生菌根時，可增加植物對土壤養分、水分的吸收，促進植物生長，提高植物對乾旱、鹽份的抵抗性，並增強植物對病害的抗、耐病性。程氏等[1]報告指出洋香瓜接種菌根菌，可使根群茁壯，提高移植存活率，促進植株的生長，增加果品品級，並可宿根栽培，提高農友收益。目前叢枝菌根菌在洋香瓜栽培上的推廣應用，已達每年350-400公頃，但年增長率相當有限，主要原因在叢枝菌根菌為絕對共生菌，利用盆栽法(pot culture)[9]生產接種原相當費時、費力，阻礙推廣面積的擴增。近年來研究人員相繼開發薄層養液法(nutrient film technique)[4,14]、氣霧耕法(aeroponic culture)[8]及Ri T-DNA 轉型根法[3,15]等技術繁殖叢枝菌根菌，但是實際可供田間應用的接種原仍以盆栽生產者為主。本研究室利用傳統盆缽法，每年生產約4000包菌土(5公斤/包)，供應洋香瓜示範推廣或農友索取之用，但限於人力、空間不足，要提高生產數量較為困難，因此如果可以提高菌土內之接種原密度，相對地用較少的菌土，仍可得相同的接種效果。

一般盆栽法使用的介質，有砂、泥炭苔、蒙特石[17]及樹皮等，或者配合其他介質調配而成，但有報告指出有機質與可利用性磷含量高不利菌根形成與孢子產生[2,6,7,10,13]，因此調配上須注意不能影響叢

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第2001號。
2. 本所嘉義農業試驗分所助理、研究員兼分所長。台灣省 嘉義市。

枝菌根菌的感染與增殖。本研究室一直以河砂作爲繁殖叢枝菌根菌的基本栽培介質，因其具有極佳的通氣性及低肥份的特點，但是相對地，其保水、保肥力差較不利於宿主植物初期的生長，Millner等人[11]研發自動澆水與施肥系統，解決此一問題。Morton等人[12]採用砂土與壤土以2：1的方式混合，作爲菌種繁殖的標準配方，本試驗則以質地較輕、保水力較佳的泥炭苔爲添加對象，探討其添加的比例、添加方式對叢枝菌根菌產孢的影響，並調查整個台農1號玉米生長期，菌根發育與孢子的變化，以提供採收期的參考。

材料與方法

一、供試叢枝菌根菌的來源與接種方法

供試叢枝菌根菌*G. mosseae*由玉米根圈土壤分離而來，經數次孢子分離、接種繁殖步驟確定爲單一菌種後，保留作爲原種。取部份原種菌土以盆栽玉米大量繁殖，成爲各項試驗所需之接種原。試驗期間所用的盆栽介質如河砂、泥炭苔、盆缽等，均事先以70℃蒸汽消毒30分鐘，放置一週後備用。接種原收集時取部份菌土及根系，利用濕篩法(wet sieving and decanting)[5]分離孢子，以計算每百克菌土之孢子數，根系則採用透化染色法[16]調查菌根形成率。菌根形成率的計算方式如下：透化染色後的根系，分別剪成約1公分長度，逢機取60段置於載玻片上，每一玻片20條根段，於光學顯微鏡下鏡檢，每一根段如有根內菌絲及叢枝體(arbuscules)或囊狀體(vesicles)即視爲已感染，計算60根段中已感染根段的百分比，即爲菌根形成率。以下各試驗均採用孢子接種，方法如下：首先菌土以濕篩法將孢子分離出來，篩出的孢子懸浮液倒入玻璃培養皿中，置於解剖顯微鏡下以拉成細針狀的玻璃吸管，吸取內容物完整的孢子，每50個孢子置於一指型管內。接種前小心移去盆栽植株周圍的河砂，使宿主植物根系露出，再以玻璃吸管吸取指型管內的孢子，將孢子溶液滴在根上，接種後蓋上河砂及澆水。接種植株2週後，每盆每公斤河砂施用1.5公克3號奧妙肥(N:P:K=18:5:11)。

二、泥炭苔添加方式對叢枝菌根菌繁殖之影響

供試宿主植物有百喜草(*Paspalum notatum* Flugge)、營多藤(*Desmodium intortum* Urb.)、玉米(*Zea mays* L.)台農1號及甘藷(*Ipomoea batatas*(L.) Lam.)台農66號等，除甘藷採用扦插苗每盆2株外，其餘三種宿主植物均以種子播種，播種前種子以0.5%次氯酸鈉表面消毒，發芽後每盆疏苗僅留2株。栽培介質爲消毒河砂與消毒泥炭苔(Finnpeat ST-400 A.2, Finland)，泥炭苔標示的水溶性氮、磷、鉀含量分別爲0.17%, 0.1%, 0.27%。泥炭苔添加方式分成混合與覆蓋兩種處理，混合處理是將河砂與10%(V/V)泥炭土混合均勻後，裝入盆缽中，每盆3公升(約5公斤)，再分別種植百喜草、營多藤、玉米及甘藷，每一宿主植物各3重覆，覆蓋處理則是先將盆缽裝入河砂，10%(V/V)泥炭苔於宿主植物播種或移植後覆蓋(mulch)於河砂表面，每一宿主植物有3重覆。供試叢枝菌根菌爲*G. mossea*，每盆接種50個孢子，接種後14周調查每百克砂土的孢子數及菌根形成率。

三、河砂與不同比例泥炭苔混合對叢枝菌根菌繁殖的影響

河砂及泥炭苔分別以4:1, 2:1及1:1(V/V)混合後，每5公斤裝1盆(盆缽直徑18公分，高20公分)，另以全砂爲對照處理，每處理3盆。供試宿主植物爲百喜草，取自盆栽百喜草成株莖部，每5公分剪取一截，除去部份葉片，以清水洗淨扦插於蛭石中，待其發根並長出新葉片後即爲繁殖宿主，每盆移植2株，移植時同時接種50個*G. mosseae*孢子。試驗期間之溫度，最高31℃最低22℃。接種後第14週，調查孢子數及菌根形成率。

四、叢枝菌根菌在宿主玉米根圈土中之繁殖消長

供試宿主植物爲台農1號玉米，種子經表面消毒後，每盆播種2顆，播種日期爲6月24日，盆栽介質爲消毒河砂(5公斤/盆)，播種後1週每盆接種50個孢子，之後覆蓋10%(v/v)消毒的泥炭苔。試驗盆栽置於簡易塑膠網室中，試驗期間網室溫度記錄，最高39℃最低22℃。玉米植株接種後第7週開始，每隔1週分別取出3盆，調查百克砂土的孢子數及菌根形成率，至玉米接種後第15週止(日期爲10月13日)。

五、供試栽培介質分析

供試河砂與泥炭苔使用前分別進行酸鹼値、EC値及有效磷(available phosphorus)的測定。測定方式是將河砂或泥炭苔與蒸餾水以1:5比例混合，利用酸鹼度計與導電度計分別測定pH及EC，有效磷的測定是採用白雷氏第一法(Bray-1 method)分析。

結　果

一、栽培介質分析

栽培介質河砂或泥炭苔與蒸餾水以1：5比例混合，測定酸鹼値、導電度，以及利用白雷氏第一法分析有效性磷，結果河砂與泥炭苔酸鹼値分別爲7.34與6.22，導電度分別是0.123與0.854(dS/m)，有效性磷含量分別爲0.77與15.13(ppm)。

二、泥炭苔添加方式對叢枝菌根菌繁殖的影響

河砂與10%泥炭苔以覆蓋或混合方式處理，調查接種後第14週百喜草、營多藤、玉米、甘藷的菌根形成率與孢子數，結果如表1。四種作物菌根形成率，在覆蓋處理分別爲百分之72.9, 18.9, 19.5及35，混合處理分別爲百分之86.7, 61.7, 31.7及69.4，由結果顯示，在四種作物上，混合處理者之菌根形成率較覆蓋處理者爲高。四種作物產生的孢子在覆蓋處理分別爲373, 464, 605, 254(個/100克土)，混合處理者分別爲773, 1115, 1424, 58(個/100克土)，除甘藷外，顯示產孢以混合處理者優於覆蓋處理者，在營多藤上達顯著差異(p=0.05)。

三、泥炭苔混合比例對叢枝菌根菌繁殖的影響

河砂與泥炭苔以1:0, 4:1, 2:1, 1:1(v/v)比例混合，於接種後第14週調查的菌根形成率，分別爲百分之82.4, 76.6, 26.3及15等，每百克土之孢子數則分別爲631.3, 362.7, 0, 0等。由圖1結果可知，完全以河砂爲栽培介質，菌根程度比混合不同比例泥炭苔的處理爲高，且泥炭苔混合量愈高，菌根感染率則愈低，孢子的產生也有相似趨勢，且泥炭苔用量在33及50%的處理，甚至未有孢子產生。

表 1. 泥炭苔施用方式對叢枝菌根菌*G. mosseae*繁殖的影響

Table 1. Effect of mulching and mixing peat moss on the spore production of *G. mosseae* in sandy pot culture

處理	孢子數(個/100克土)					菌根形成率(%)		
	百喜草	營多藤	玉米	甘藷	百喜草	營多藤	玉米	甘藷
覆蓋	373a*	464b	605a	254a	72.9	18.9	19.5	35.0
混合	773a	1115a	1424a	58b	86.7	61.7	31.7	69.4

*Means in the same column followed by the different letter are significantly different (p=0.05) by Duncan's multiple range test.

四、叢枝菌根菌在宿主玉米根圈土中之繁殖消長

叢枝菌根菌*G. mosseae*在盆栽台農1號玉米根圈土的繁殖調查，是從接種後第7週開始如圖2，其菌根形成率與孢子數分別爲7.23%與20個/100克土，而後逐漸增加，至接種後第11週出現一波高峰，此時

菌根形成率達52.2%，每百克土含孢子數1064.3個，而後逐漸降低，至第15週時菌根形成率與孢子數分別爲16.1%與197.7個/100克土。在夏季整個盆栽玉米的生長期，抽穗約出現在接種後第6週，接種後第12週植株地上部開始乾枯，而菌根形成率與孢子數約自此時開始逐漸降低。

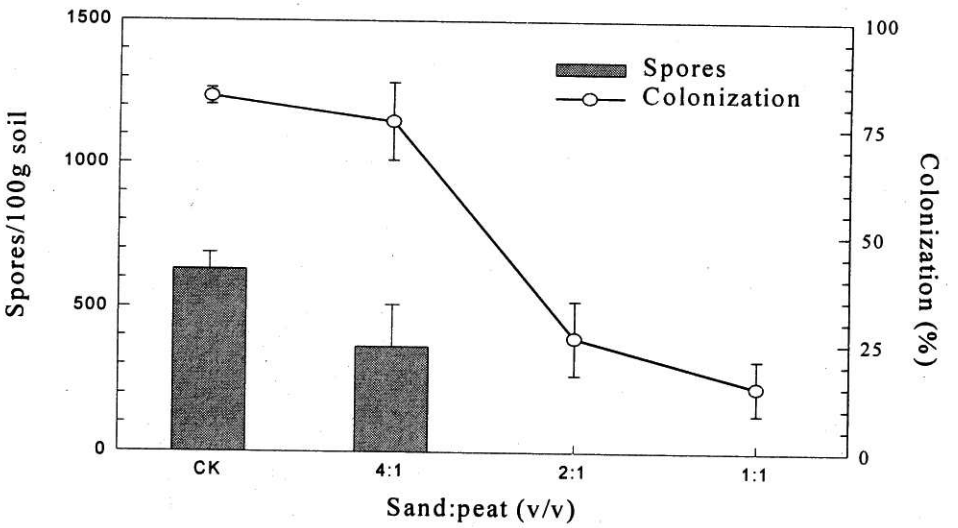


圖 1. 河砂添加泥炭苔的比例對叢枝菌根菌*G. mossrae* 繁殖的影響。

Fig. 1. Effect of mixing ratio between peat moss and sand on the spore production of *G. mosseae* in pot culture (bars indicate standard error).

討 論

河砂具有通氣佳、養分少的優點，適於作爲叢枝菌根菌的繁殖介質，但對宿主植物而言，並不利於其初期的生長，尤其在夏天與冬天的季節，而泥炭苔(peat moss)具有良好的保水性及養分低，可彌補河砂的缺點，頗爲適合作爲添加之用。在泥炭苔混合試驗中，發現添加泥炭苔確可改善宿主植物初期的生長，並減少補植的情形發生，但其對叢枝菌根菌繁殖的影響，結果顯示泥炭苔添加的比例愈高，百喜草菌根形成率降低，產孢減少，添加量超過20%以上，接種後第14週，仍未發現孢子產生，而添加20%泥炭苔者，每百克土含有363個*G. mosseae*孢子，仍較對照未添加者之631個孢子爲少，可見泥炭苔中含有不利叢枝菌根菌繁殖的因子。有些報告指出有機質含量[10]與磷肥[6,7,13]，不利叢枝菌根菌的繁殖，因此推測可能是泥炭苔中磷肥與有機質含量抑制叢枝菌根菌繁殖，因爲部份商業產品可能在產品中添加化學肥料，這其中又以磷肥對叢枝菌根菌的繁殖影響較大。經測定後，供試泥炭苔的可溶性磷含量爲15.1ppm，EC值爲0.854(ds/m)，顯示有可能添加了化學性磷肥。磷肥濃度對叢枝菌根菌的影響，已有許多報告發表，少量磷有助於叢枝菌根菌孢子發芽與發芽管的生長，但是有效性磷肥的濃度太高，對孢子發芽與菌根發展則有抑制作用[19]，另一方面磷的有效性常受土壤質地、酸鹼值等因子影響，要判斷有效性磷的濃度達何種標準，始對叢枝菌根菌的繁殖有影響確實不易，而此次泥炭苔的可溶性磷雖達15.1ppm，是否即對叢枝菌根菌造成抑制作用，仍有待繼續探討。

泥炭苔混合量過高影響叢枝菌根菌的繁殖，混合方式亦會影響孢子篩洗後的鏡檢工作，因此若將泥炭苔添加量減至10%，並與覆蓋處理比較對產胞的影響，採用覆蓋方式較易將表層泥炭苔去除，具

有鏡檢時干擾較少的優點，但由表1的結果，四種宿主植物中除台農66號甘藷外，百喜草、營多藤、台農1號玉米之菌根形成率與百克土之孢子數，均以混合方式高於覆蓋方式，但為什麼會有此種現象原因並不清楚。比較宿主植物間的產孢情形，供試玉米在混合方式之處理中每百克土有1424個孢子，

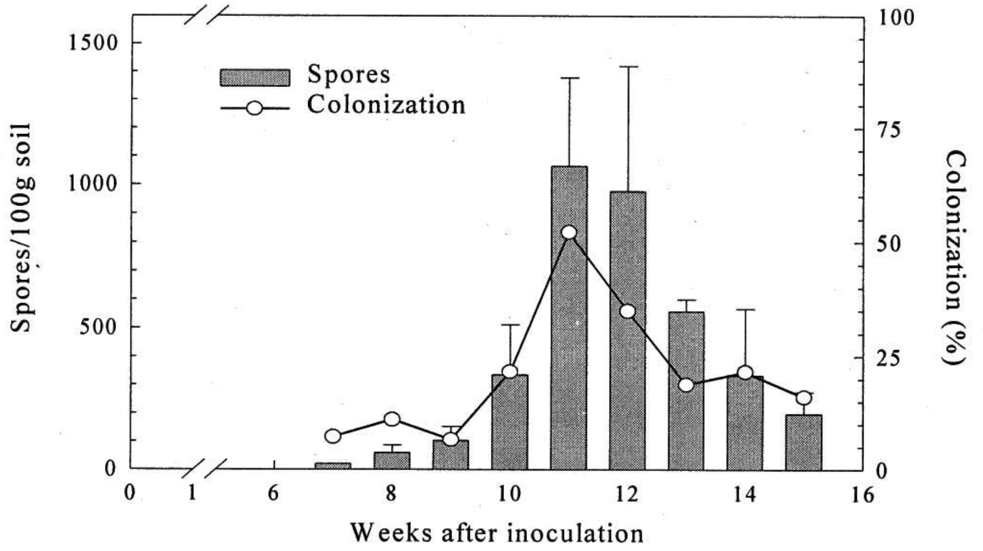


圖 2.叢枝菌根菌*G. mosseae* 在玉米根圈土中的消長。

Fig. 2. Spore fluctuation of *G. mosseae* in corn rhizosphere (bars indicate standard error).

而覆蓋處理之土中則為605個*G. mosseae*孢子，高於其他宿主植物，營多藤與百喜草為宿主者孢子數其次，台農66號甘藷則是產孢較差的宿主植物，但甘藷對其他*Glomus*屬菌種可能是相當適合的宿主植物(未發表資料)。由於宿主植物是影響叢枝菌根菌繁殖的因子之一[18,20]，在本次試驗使用的四種宿主植物中，玉米是繁殖*G. mosseae*較適當的宿主之一，有需要進一步瞭解*G. mosseae*在玉米根圈的發育情形，以取得產胞量最適期的資料，提供菌土採收的參考，如圖2所示，*G. mosseae*的繁殖確有一個高峰期出現，約在接種後第11週，或是抽穗後第5週，而後孢子有減少產生的趨勢，但高峰期可能受環境因子如溫度的影響，而在時間上有部份的差異。

引用文獻

1. 程永雄、莊明富、杜金池。1993。內生菌根菌*G. clarum*應用在洋香瓜生產上之效益評估。中華農業研究 42:74-84。
2. Biermann, B., and R. G. Linderman. 1983. Effect of container plant growth medium and fertilizer phosphorus on establishment and host growth response to vesicular-arbuscular mycorrhizae. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 108:962- 971.
3. Diop, T. A., G. Becard, and Y. Piche. 1992. Long-term in vitro culture of an endomycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*, on Ri T-DNA transformed roots of carrot. Symbiosis 12:249-259.
4. Elmes, R. P., C. M. Hepper, D. S. Hayman, and J. O'Shea. 1984. The use of vesicular-arbuscular mycorrhizal roots by the nutrient film technique as inoculum for field sites. Ann. Appl. Biol. 104:437-441.
5. Gerdemann, J. W., and T. H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet-sieving and decanting. Trans Br. Mycol. Soc. 46:235-244.
6. Graham, J. H., and L. W. Timmer. 1984. Vesicular-arbuscular mycorrhizal development and growth response of rough lemon in

soil and soilless media: Effect of phosphorus source. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:118-121.

7. Hayman, D. S. 1982. Influence of soils and fertility on activity and survival of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Phytopathology 72:1119-1125.

8. Hung, L. L., and D. M. Sylvia. 1988. Production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus inoculum in aeroponic culture. Appl. Environ. Microbiol. 54:353-357.

9. Menge, J. A. 1984. Inoculum production. pp. 187-203. In: VA Mycorrhiza, C. L. Powell and D. J. Bagyaraj, eds. CRC Press, Boca Raton, FL. 234pp.

10. Menge, J. A., W. M. Jarrell, C. K. Labanauskas, J. C. Ojala, C. Huszar, E. L. V. Johnson, and D. Sibert. 1982. Predicting mycorrhizal dependency of Troyer citrange on *Glomus fasciculatus* in California citrus soils and nursery mixes. Soil Sci. Soc. Amer. J. 46:762-768.

11. Millner, P. D., and D. G. Kitt. 1992. The Beltsville method for soilless production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. Mycorrhiza 2:9-15.

12. Morton, J. B., S. P. Bentivenga, and W. W. Wheeler. 1993. Germplasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. Mycotaxon 48:491-528.

13. Mosse, B. 1973. Advances in the study of vesicular-arbuscular mycorrhiza. Ann. Rev. Phytopathol. 11:171-196.

14. Mosse, B., and J. P. Thompson. 1984. Vesicular-arbuscular mycorrhizal inoculum production. I. Exploratory experiments with beans (*Phaseolus vulgaris*) in nutrient flow culture. Can. J. Bot. 62:1523-1530.

15. Mugnier, J., and B. Mosse. 1987. Vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in transformed root-inducing T-DNA roots grown axenically. Phytopahtology 77:1045-1050.

16. Phillips, J. M., and D. S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:158-161.

17. Plenchette, C., V. Furlan, and J. A. Fortin. 1982. Effects of different endomycorrhizal fungi on five host plants grown on calcined montmorillonite clay. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 107:535-538.

18. Simpson, D., and M. J. Daft. 1990. Spore production and mycorrhizal development in various tropical crop host infected with *Glomus clarum*. Plant and Soil 121:171-178.

19. Siqueira, J. O., D. M. Sylvia, J. Gibson, and D. H. Hubbell. 1985. Spores, germination, and germ tubes of vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi. Can. J. Microbiol. 31:965-972.

20. Struble, J. E., and H. D. Skipper. 1988. Vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spore production as influenced by plant species. Plant and Soil 109:277-280.

48-4-6

Effects of Peat Moss Amendment on Propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungi[1]

Ming-Fuh Chuang and Yung-Hsiung Cheng[2]

Summary

Sand is a good medium for inoculum production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, because of its high aeration and lower fertility, but it has poor water-conserved and buffering ability. In contrast, peat moss has high water-conserved ability, so we try to amend sand with peat moss to improve initial growth of host plants, and to increase colonization and spore of VAM fungi. Effect of 10% peat moss mulched or mixed with sand on colonization and spore production of *G. mosseae* are tested in four host plants of bahiagrass, intortum, corn, and sweet potato. Results indicated sand mixed with peat moss is better than those mulched with peat moss. Then, the effects of sand mixed with peat moss in ratio of 1/5, 1/3, 1/2 on propagation of *G. mosseae* in rhizospheric soil of bahiagrass were conducted. Results indicated that the amendment of peat moss in sand could improve initial growth of host plants, but colonization or spore production was the highest in treatment without peat moss amendment. When amended volume of peat moss was over 1/4, there was no spore in rhizospheric soil at 14 weeks after inoculation. Periodic investigation were conducted to monitor propagation of *G. mosseae* in the rhizosphere of corn, and results indicated that root colonization and spore production in soil gradually increased, and reached the highest at 11 weeks after inoculation, and then decreased. The results showed that spore production was the highest in sand without any amendment. Peat moss was not beneficial to colonization and spore production, if amended with sand.

Key words: Peat moss, Pot culture, Arbuscular mycorrhizal fungi

---

1. Contribution No.2001 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectively, Assistant and Director, Chiayi Agricultural Experiment Station, TARI, Chiayi, ROC.

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 71～83(1999)

番椒(*Capsicum* spp.)品系抗青枯病之篩選[1]

林俊義[2] 許秀惠[3] 王三太[4] 曹幸之[5] 顏志恆[3] 蕭吉雄[4]

摘要：以剪葉接種法評估不同番椒品系對青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)之抗感性，共評估二批材料，計 123個品系。第一批供試35個品種(系)，皆爲辣椒類型，其中包含 13 個臺灣商業品種與 22 個農試所自交系，發病指數最低爲 11.4%，最高爲 100%，而高抗、抗、感、高感病等級各有 2、19、11 及 3 個品種(系)，顯示品種(系)間抗感病性差異明顯。供試品種(系)中達高抗病者爲自交系的'4207-5-37-4-2-2-5'與'4207-16-45-2-2-1-1'，但商業品種中'生生199'、'美香'、'生生193'、'生生194'、'千里香'等 5 個品種達抗病的等級，屬高感病等級者爲商業品種的'長香'、'新香'及'生生197'。自留品系在高抗、抗、感及高感四等級的比率分別占 9.2、63.6、27.2 及 0%，而商業品種則爲 0、38.5、38.5 及 23.0%，顯示選留品系較商業品種抗青枯病。第二批供試 88 個品種(系)，包括辣椒與甜椒類型，爲來自國家種源庫保存之種源，其中高抗、抗、感、高感四等級各有 28、27、26 及 7 個品種(系)，發病指數最低爲 1.4%，最高 90.0%，屬高感等級的 7 個品種(系)皆爲甜椒類型，而高抗的 28 個品種(系)則皆爲辣椒類型。

關鍵詞：番椒、青枯病、抗病篩選

前　言

番椒爲茄科番椒屬之一年生或多年生作物，包括甜椒與辣椒。台灣總栽培面積約爲三千公頃[(3)]，主要產地有屏東、雲林、南投、嘉義、彰化、高雄、花蓮等七個縣市。辣椒喜溫暖、乾燥氣候，較番茄耐高溫，但不耐低溫，辣椒對溫度的適應性比甜椒廣。番椒根系不太發達，不耐淹水。番椒主要的病害有疫病、病毒病、炭疽病、細菌性斑點病、白粉病、青枯病、立枯病等，其中除疫病、病毒病與炭疽病外，最重要爲高溫期的青枯病與細菌性斑點病兩種細菌性病害危害嚴重。其中由青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*, 原學名爲 *Pseudomonas solanacearum*) 引起的細菌性萎凋病(bacterial wilt)又稱青枯病，分佈遍及全世界，是熱帶及亞熱帶地區發生相當普遍且頗具威脅性的植物細菌性病害之一[(1,5,7,8)]，而台灣氣候高溫多濕，青枯病發生也相當普遍且嚴重，已有多種經濟作物受其危害，造成損失頗鉅[(6)]，尤其在夏季，青枯病常是茄科作物栽培上的限制因子之一。

青枯病菌是一種土壤傳播性病原菌，在植株上造成系統性感染，因此防治不易，目前防治青枯病的方法雖然很多，如種植抗病品種，使用健康種苗，施用土壤添加物，施用拮抗菌，輪作，田間衛

1.行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2002 號。

2.本所所長。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

3.本所植病系副研究員、博士後研究。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

4.本所園藝系助理研究員、研究員兼主任。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

5.國立臺灣大學園藝系副教授。台北市。

生，改良耕作方式或土壤燻蒸等[1,6,7]；然而其中以採用抗病品種才是最根本的方法。目前已有抗青枯病之番椒品種(系)[4,9,10,11]，但有些抗病品種(系)，在某些地方卻表現不抗病，顯示抗病品種之選育與當地存在之青枯病菌菌系息息相關，因此國外選出抗病之品種(系)在臺灣栽植是否仍有抗病性，必需利用臺灣的菌系進一步篩選加以確認，以獲得適用於臺灣之品種(系)，本研究即以本所收集來自各地之番椒品種(系)及自留抗細菌性斑點病自交系為材料，測試對臺灣青枯病菌株之抗感性，以供育種之參考。

材料與方法

供試番椒品種(系)來源

試驗的材料分為二批，第一批含農試所 22 個抗細菌性斑點病自交系與臺灣 13 個一代雜交商業品種共計 35 個品種(系)，皆為辣椒類型，品種(系)名稱、世代，如表 1 所示。第二批為國家種原庫提供，共 88 個品種(系)包括辣椒與甜椒類型，皆源自亞洲蔬菜中心，其品種(系)名稱、來源及亞蔬編號如表 2 所示。

供試青枯病菌菌源之製備

將保存於蒸餾水中之 Ps95 菌株(中興大學徐世典教授提供，屬於 race1，biovar 4)劃線於 TTC 培養基上，於 30℃下培養 48 小時後，選取具病原性之典型菌落，再劃線於 PDA 培養基上，並於 30℃下培養 24 小時後懸浮於水中，以Spectrophotometer 在波長 A620nm 下，調整 O.D. 值至 0.3 作為接種源，其濃度約為 108 cfu/ml。

接種及調查方法：

所有供試植株均栽種於 35 孔穴之育苗盤中，每一品種(系)接種 10 株，於播種後 47 天之植株(約 5~6 葉)進行接種，接種時以剪刀沾取上述接種源，每沾一次接種源剪一植株，剪的部位為供試植株完全展開之葉片(由上位葉往下數，約第三葉)，剪除面積約為整個葉片之1/3，接種後置30℃生長箱中，21 天後調查發病情形。病害等級分為 7級，分別為

0：無病徵
1：接種葉黃化或莖壞疽
2：接種葉黃化且莖壞疽
3：1葉萎凋
4：2葉萎凋
5：3葉萎凋
6：＞3葉萎凋
7：萎凋死亡

發病級數再用於換算發病指數(disease index, DI)，

$$發病指數=\frac{N0\times0+N1\times1+N2\times2+N3\times3+N4\times4+N5\times5+N6\times6+N7\times7}{10\times7}\times100\%$$

其中 N0、N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7分別代表 0、1、2、3、4、5、6、7 發病等級株數。發病指數低於 25% 判定為高抗病，25-50%為抗病，50-75%為感病，75-100%為高感病。另外，為了解每個品種(係)間植株實際萎凋死亡情形，因此計算其萎凋比率(wilt percentage)，指供試植株中實際萎凋死亡株數所占比率。

結果與討論

第一批供試 35個品種(系)中，包含 22 個農試所自留品系與 13 個商業雜交品種，經接種後其發病指數如表3所示，最低爲 11.4%，最高爲100%，而高抗、抗、感、高感病等級各有 3、18、11、3 個品種(系)(表5)，顯示品種(系)間抗感性差異甚大。在供試的 13 個商業品種中，高抗、抗、感及高感病四等級的比率分別爲 0、38.5、38.5 及 23.1，僅‘生生199’、‘美香’、‘生生193’、‘生生194’及‘千里香’等 5 個品種達抗病的等級，其中‘生生193’爲目前主要之商業品種，而‘美香’及‘生生194’在先前試驗顯示爲抗細菌性斑點病品種[2]，因此這些同時抗青枯病與細菌性斑點病之品種，除了具有直接應用的價値外，且可從其後裔選拔純化同時抗兩種病害的自交系。在 35個供試品系中高感病等級的‘長香’、‘新香’、‘生生197’皆爲商業品種，其中‘新香’10 株接種後全部萎凋死亡，可做爲日後接種試驗的感病對照。供試商業品種中一代交配種的生生194(Avon Eg)接種後10株中雖有一株萎凋，但有三株僅接種葉黃化，顯示同一品種不同植株間對青枯病之反應有所差異，亦即抗性呈分離較大狀態，所以從其中可能可以選拔出抗病株並加以純化；而供試商業品種中一代交配種生生199(Smatra)有六株接種葉黃化與莖壞疽，僅一株出現 二個葉片萎凋，顯示其抗性較整齊。

供試 22 個自留六代的自交系中，'4207-5-37-4-2-2-5'、'4207-5-37-4-1-2-3'與'4207-16-45-2-2-1-1'，達高抗等級，發病指數分別只有 11.4、18.6與 24.3，而且這三個品系對細菌性斑點病亦具抗性[2]。自留品系在高抗、抗、感及高感四等級的比率分別佔13.6、59.1、27.3 及 0%。高抗與抗病的比率合計超過72.8%，遠高於商業品種的 38.5%，而且自留品系中沒有高感病品系，推測自留品系較商業品種抗病的可能原因爲自留品系多代在高溫期選拔，經田間自然發病環境壓力下篩選存活，雖未經人工接種選留，仍具一定程度抗性，其中以源自印度的‘4207’選留後裔最具抗性，在 12 個‘4207’選留後裔之品系中有三個屬於高抗，七個屬於抗病等級；而(4501-3×Shioushuei)後裔則多屬於感病等級，較‘4207’後裔感病。‘4501’爲由一代交配種‘百香’選拔之株系，‘百香’的發病指數爲 54.3%，而其雜交後裔發病指數介於 41.4與 72.9之間，六個品系平均發病指數爲 60.3，與‘百香’相差不大；另外，自留系中‘4207-5-37-4-1-2-2’雖有一株萎凋，但發病指數只有 28.6%，主要原因爲有一株無病徵與五株接種葉黃化，可能該品系對青枯病抗性仍呈分離，尚待進一步純化。

第二批國家種原庫的 88 個品種(系)之篩選結果如表4所示，發病指數最低爲‘Heart Shaped’僅1.4%，而‘California Wonder 300’最高，其值爲 90.0%，顯示品種(系)間抗感性差異明顯。高抗的 28個品系皆爲辣椒類型(表 5)，而高感的七個品系皆爲甜椒類型(表 5)，其中‘656 Calwonder’、‘Yolo Wonder’、‘California Wonder 300’皆爲親緣較近品種。門馬信二[4]測試不同來源甜椒及辣椒，同樣發現‘California Wonder’爲高感病品種，供試品種中有16個甜椒品種，其發病株率皆超過70.0%，屬較感病類型，但來自日本的六個甜椒品種(系)發病株率爲0，八個低於70.0%，而引自中國的八個甜椒品種(系)中，亦有二個低於 70%，顯示甜椒品系雖然一般較感病，但仍可找出抗病之品(種)系。同樣地，本研究之供試材料中編號爲67、70、77、92及93的甜椒品種屬抗病性，雖未達高抗等級，但接種植株均未出現萎凋死亡，可見這些甜椒類型的品系對青枯病仍具有某種程度之抗病性。甜椒類型發病指數最低者爲編號 78 的 34.3%，其中亦有一株無病徵及四株僅接種葉黃化，顯示在甜椒類型可能可經由選拔抗病單株留種純化，以提高對青枯病之抗性。

供試 88 個種源中屬於 *Capsicum annum* 近緣種的有三種，即 *C. baccatum*，*C. frutescens* 及 *C. chinense*，其中供試的 *C. frutescens* 二個品系皆屬高抗病性， *C. baccatum* 的三個品系分屬於高抗、抗及感病三個等級，而唯一的 *C. chinense* 品系則屬感病等級。門馬信二[4]在 48個近緣種測試中，低於或等於 20%發病株率的主要爲 *C. frutescens* 及 *C. baccatum*，而 *C. chinense* 較感病，發病率最低亦有 40%，

發病率比 *C. frutescens* 及 *C. baccatum* 爲高，顯示 *C. frutescens* 對青枯病有較高的抗性。本研究結果與門馬信二所得結果相似，但有關 *C. baccatum* 對青枯病的抗性則略有差異。

亞蔬中心進行青枯病的篩選時以 MC4 爲抗病對照[12]，本研究供試四個 MC4 品系，其發病等級有三個屬高抗，一個雖屬抗病等級，指數亦非常接近高抗等級。R1-26(17)在本所與亞蔬測試皆屬高抗，而 MC5 在二者測試皆略高於 MC4 與 R1-26(17)，顯示本所與亞蔬測試的相同品種部分，結果相符。門馬信二[4]調查的甜椒品系中，Ruby King 的萎凋比率高達 88.9%，而本研究中的發病指數亦高達 73.5%屬感病等級，二者結果相若。因此，利用臺灣分離之青枯病菌以剪葉方式篩選，雖然萎凋比率有所差異，但以發病指數來比較，顯示所得結果頗爲相似，可達到區別番椒品種(系)對青枯病抗性之差異，進而作爲選拔抗感病性的指標。

誌 謝

感謝中興大學徐世典教授提供菌株，本所作物種原室提供番椒品系。

引用文獻

1. 徐世典。1991。臺灣植物青枯病菌之生態與防治。植保會刊 33:72-79。
2. 曹幸之、許秀惠、王三太、蕭吉雄、曾明懋。1994。辣椒抗細菌性斑點病之篩選。中國園藝會八十三年度年會論文宣讀。第18頁。
3. 臺灣省政府農林廳編。1999。臺灣農業年報(民國八十八年版。
4. 門馬信二。1997。 スナ科野菜の青枯病抵抗性育種の現狀と今後の課題[3]。 農業および園藝 72:1172-1178。
5. Buddenhagen, I. W., and Kelman, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 2:203-230.
6. Hartman, G. L., and Elphinstone, J. G. 1994. Advances in the control of *Pseudomonas solancearum* race 1 in major food crops, pp.157-177. In: Hayward, A. C. and Hartman, G. L. (eds). Bacterial Wilt, the Disease and its Causative Agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallongford, UK. 259 pp.
7. Hayward, A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* Annu. Rev. Phytopathol. 29: 65-87.
8. Kelman, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum.* N.C. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. 99. 194pp.
9. Matsunaga, H., Sakata, Y., and Monma, S. 1993. Screening sweet pepper accessions for resistance to bacterial wilt. Capsicum and Eggplant Newsletter 12:77-78.
10. Peter, K.V., Goth, R. W., and Webb. R. E. 1984. Indian hot peppers as new sources of resistance to bacterial wilt, phytophthora root rot, and root-knot nematode. Hort. Sci. 19:277-278.
11. Wang, J. F., and Berke, T. 1997. Sources of resistance to bacterial wilt in *Capsicum annuum.* Bacterial Wilt Newsletter14:3-4.

表1. 供試辣椒農試所自留品系及臺灣商業品種之名稱、來源及世代

Table 1. Name, origin and generation of the tested TARI inbreeding lines and local commercial cultivars of chilli

Code	Line (cultivar)	Origin	Generation
001	955-1-19-4-1-5-4	TARI	S6
002	4207-5-37-4-1-2-2	TARI	S6
003	4207-5-37-4-1-2-3	TARI	S6
004	4207-5-37-4-1-4-5	TARI	S6
005	4207-5-37-4-2-2-5	TARI	S6
006	4207-5-37-4-2-3-3	TARI	S6
007	4207-5-37-4-3-1-3	TARI	S6
008	4207-5-37-4-3-1-5	TARI	S6
009	4207-5-37-4-3-3-3	TARI	S6
010	4207-16-28-5-3-1-1	TARI	S6
011	4207-16-45-2-2-1-1	TARI	S6
012	4207-16-45-2-3-1-5	TARI	S6
013	4207-16-45-2-3-2-4	TARI	S6
014	4446-OP-6-2-2-1-7	TARI	S5
015	4446-OP-6-2-2-5	TARI	S4
016	Shioushuei-OP-2-3-2-1-8	TARI	S5
017	(4501-3 Shioushuei)-5-1-2-5	TARI	F4
018	(4501-3 Shioushuei)-5-2-1-1	TARI	F4
019	(4501-3 Shioushuei)-5-3-1-3	TARI	F4
020	(4501-3×Shioushuei)-5-5-1-2	TARI	F4
021	(4501-3×Shioushuei)-5-5-3-5	TARI	F4
022	(4501-3×Shioushuei)-5-5-4-9	TARI	F4
023	Ever Flavor(千里香)	Known You Seed Co.	F1
024	Hot Beauty(美香)	Known You Seed Co.	F1
025	Stars(群星)	Known You Seed Co.	F1
026	Long Chili(長香)	Known You Seed Co.	F1
027	Golden Heat(金香)	Known You Seed Co.	F1
028	Chain Fair(千惠)	Known You Seed Co.	F1
029	Hero(英雄)	Known You Seed Co.	F1
030	Passion(百香)	Known You Seed Co.	F1
031	New Comer(新香)	Known You Seed Co.	F1
032	Delicacy(生生193)	Evergrow Seed Co.	F1
033	Avon Eg(生生194)	Evergrow Seed Co.	F1
034	Hungariana(生生197)	Evergrow Seed Co.	F1
035	Smatra(生生199)	Evergrow Seed Co.	F1

表2. 供試辣椒農試所自留品系及臺灣商業品種之名稱、來源及世代

Table 2. Name, origin and generation of the tested TARI inbreeding lines and local commercial cultivars of chilli

Code	Line (cultivar)	Origin	AVRDC Code
036	CATIE 7798	Costa Rica	C00085
037	UNNAMED	Phillippines	C00495
038	SERRANO CHILI	U.S.A	C00517
039	OHYATSUBUSA	Japan	C00834
040	PEPPER(*Capsicum baccatum*)	United Kindom	C00948
041	PEPPER	Honduras	C01720
042	NUM-59 R.B.-L.G.G	Honduras	C00645-1
043	80015	Ethiopia	C00665-1
044	Pepper	Turkey	C00300-1
045	FARMERS NEWCOMER	Taiwan	C00001
046	PASSION	Taiwan	C00005
047	YOUNG CHIAO CHIAO	Taiwan	C00006
048	672 HUNGARIAN WAX	U.S.A	C00011
049	TWIST GREEN	Korea	C00019
050	CH172-VERDE	Guatemaia	C00042-1
051	CATIE 7201-1-3-4(*Capsicum baccatum*)	Costa Rica	C00044
052	CATIE 10916-2-3-4-5-6	Costa Rica	00055
053	CATIE 7802	Costa Rica	C00077
054	CATIE 10994-2-3-4-5	Costa Rica	C00084
055	CATIE 10666-2-3-6	Costa Rica	C00086
056	CATIE 9095-1-2-3-5-6	Costa Rica	C00087
057	THAILAND 84-1	Thailand	C00098
058	MC4	Malaysia	C00104
059	MC4	Malaysia	C00104-2
060	MC4	Malaysia	C00104-3
061	MC4	Malaysia	C00104-7
062	MC5	Malaysia	C00105-3
063	PEPPER	Malaysia	C00105-5
064	NEW STAR	Taiwan	C00113
065	RUBY KING	Taiwan	C00116-2
066	BRUINSMA WONDER	Netherlands	C00129-5
067	GYPSY	U.S.A	C00131
068	656 CALWONDER	U.S.A	C00152
069	671 HYBELLE	U.S.A	C00153-1

續表2

Code	Line (cultivar)	Origin	AVRDC Code
070	673 LADY BELL	U.S.A	C00154
071	673 LADY BELL	U.S.A	C00154-1
072	YOLO WONDERL	U.S.A	C00157
073	YOLO WONDER L	U.S.A	C00157-3
074	YOLO WONDER B	U.S.A	C00159-2
075	CALIFORNIA WONDER 300(*TMR*)	U.S.A	C00161-3
076	PEPPER	U.S.A	C00196-1
077	SWEET BANANA	U.S.A	C00200-1B
078	SWEET BANANA	U.S.A	C00200-2
079	PEPPER	U.S.A	C00222
080	PEPPER	India	C00222-1
081	PEPPER	Mexico	C00225-1C
082	AGRONOMICO NO.8	U.S.A	C00227-1
083	PEPPER	U.S.A	C00229
084	PERENNIAL HDV	France	C00265-1
085	BASTIDON HDV	France	C00267
086	SERRAND 1534 PAUL SMITH'S	U.S.A	C00268
087	PEPPERONCINI		C00274
088	SERRAHO CHILI PVYRES	Netherlands	C00280
089	HAD 248	France	C00284
090	PEPPER	Turkey	C00296
091	PEPPER	Turkey	C00297
092	PEPPER	Turkey	C00297-B
093	PEPPER	Turkey	C00297-C
094	PEPPER	Turkey	C00299
095	PI152225(Capsicum chinense)	Peru	C00303
096	TABASCO(Capsicum frutescens)		C00306
097	UNKNOWN(Capsicum frutescens)		C00309
098	UNKNOWN	Taiwan	C00311
099	PEPPER(Capsicum baccatum)	Ecuador	C00313
100	U 276	Hungary	C00320
101	DELGADO	Netherlands	C00322
102	K5	Malaysia	C00325
103	VAR 6-1	Malaysia	C00326
104	LOCAL MEDIUM LONG	Malaysia	C00327
105	PJ	Malaysia	C00328

續表2

Code	Line (cultivar)	Origin	AVRDC Code
106	CILI PUTIH KELANTAN	Malaysia	C00330
107	BUKIT GAMBIR	Malaysia	C00311
108	BUKIT GAMBIR	Malaysia	C00331-1
109	B18 PUCHONG	Malaysia	C00332
110	CP NO.6(CILI PADI)	Malaysia	C00333
111	ACC.MED LONG	Malaysia	C00335
112	ACC.45 IPCH3	Malaysia	C00336
113	ASSORTED RED	Malaysia	C00338
114	HEART SHAPED	Malaysia	C00339
115	CANAPE	Hungary	C00342
116	QIEI MEN	China	C00344
117	K1	Malaysia	C00350
118	K2	Malaysia	C00351
119	R1-22(19)	Malaysia	C00369
120	RI-2(20)	Malaysia	C00370
121	RI-26(17)	Malaysia	C00373
122	RI-35(4)	Malaysia	C00375
123	NO.79	Malaysia	C00377

表 3. 農試所自留辣椒品系及台灣商業品種接種青枯病菌後之植株萎凋率、發病指數與抗病等級
Table 3. The wilt percentage, disease index(DI) and resistance level of TARI inbreeding lines and local commercial cultivars of chilli to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*

Code	Variety (line)	Wilt(%)	DI(%)	Resistance level
5	4207-5-37-4-2-2-5	0%	11.4%	Highly resistant
3	4207-5-37-4-1-2-3	0%	18.6%	Highly resistant
11	4207-16-45-2-2-1-1	0%	24.3%	Highly resistant
1	955-1-19-4-1-5-1	0%	28.6%	Resistant
2	4207-5-37-4-1-2-2	10%	28.6%	Resistant
12	4207-16-45-2-3-1-5	0%	30.0%	Resistant
4	4207-5-37-4-1-4-5	0%	31.4%	Resistant
35	Smatra(生生199)	0%	31.4%	Resistant
13	4207-16-45-2-3-2-4	0%	34.3%	Resistant
14	4446-OP-6-2-2-1-7	0%	34.3%	Resistant
24	Hot Beauty(美香)	0%	34.3%	Resistant
32	Delicacy(生生193)	0%	34.3%	Resistant
15	4446-OP-6-2-2-5	0%	35.7%	Resistant
33	Avon Eg(生生194)	10%	37.1%	Resistant
10	4207-16-28-5-3-1-1	0%	40.0%	Resistant

續表3

Code	Variety (line)	Wilt(%)	DI(%)	Resistance level
19	(4501-3 Shioushuei)-5-3-1-3	10%	41.4%	Resistant
20	(4501-3 Shioushuei)-5-5-1-2	10%	45.7%	Resistant
9	4207-5-37-4-3-3-3	10%	47.1%	Resistant
16	Shioushuei-OP-2-3-2-1-8	0%	47.1%	Resistant
8	4207-5-37-4-3-1-5	10%	48.6%	Resistant
23	Ever Flavor(千里香)	20%	48.6%	Resistant
7	4207-5-37-4-3-1-3	10%	51.4%	Susceptible
27	Golden Heat(金香)	20%	54.3%	Susceptible
29	Hero(英雄)	30%	54.3%	Susceptible
30	Passion(百香)	20%	54.3%	Susceptible
6	4207-5-37-4-2-3-3	20%	55.7%	Susceptible
25	Stars(群星)	30%	60.0%	Susceptible
17	(4501-3×Shioushuei)-5-1-2-5	30%	65.7%	Susceptible
22	(4501-3×Shioushuei)-5-5-4-9	30%	66.1%	Susceptible
18	(4501-3×Shioushuei)-5-2-1-1	50%	70.0%	Susceptible
21	(4501-3×Shioushuei)-5-5-3-5	40%	72.9%	Susceptible
28	Chain Fair(千惠)	50%	74.3%	Susceptible
26	Long Chili(長香)	60%	80.0%	Highly susceptible
34	Hungariana(生生197)	70%	82.9%	Highly susceptible
31	New Comer(新香)	100%	100.0%	Highly susceptible

表 4. 國家種原庫番椒種原品種(系)之類型及接種青枯病菌後之萎凋率、發病指數與抗病等級

Table 4. The wilt percentage, disease index (DI) and resistance level of *Capsicum* spp.from National Office of Plant Germplasm to bacterial wilt caused by *R. solanacearum*

Code	Variety (line)	Type	Wilt(%)	DI(%)	Resistant level
114	HEART SHAPED	Chilli	0%	1.4%	Highly resistant
104	LOCAL MEDIUM LONG	Chilli	0%	4.3%	Highly resistant
56	CATIE 9095-1-2-3-5-6	Chilli	0%	5.7%	Highly resistant
97	UNKNOWN(*Capsicum frutescens*)	Chilli	0%	5.7%	Highly resistant
54	CATIE 10994-2-3-4-5	Chilli	0%	7.1%	Highly resistant
57	THAILAND 84-1	Chilli	0%	8.6%	Highly resistant
52	CATIE 10916-2-3-4-5-6	Chilli	0%	10.0%	Highly resistant
63	PEPPER	Chilli	0%	10.0%	Highly resistant
42	NUM-59 R.B.-L.G.G	Chilli	0%	11.4%	Highly resistant
96	TABASCO(*Capsicum frutescens*)	Chilli	0%	14.3%	Highly resistant
106	CILI PUTIH KELANTAN	Chilli	0%	15.7%	Highly resistant

續表4

Code	Variety (line)	Type	Wilt(%)	DI(%)	Resistant level
111	ACC.MED LONG	Chilli	0%	15.7%	Highly resistan
59	MC 4	Chilli	0%	17.1%	Highly resistan
102	K5	Chilli	0%	20.0%	Highly resistan
46	PASSION	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
51	CATIE 7201-1-3-4(*Capsicum baccatum*)	Chilli	10%	21.4%	Highly resistant
55	CATIE 10666-2-3-6	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
79	PEPPER	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
117	K1	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
118	K2	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
119	R1-22(19)	Chilli	0%	21.4%	Highly resistant
41	PEPPER	Chilli	0%	22.9%	Highly resistant
49	TWIST GREEN	Chilli	0%	22.9%	Highly resistant
120	R1-22(20)	Chilli	0%	22.9%	Highly resistant
122	R1-35(4)	Chilli	0%	22.9%	Highly resistant
60	MC 4	Chilli	0%	24.3%	Highly resistant
109	B18 PUCHONG	Chilli	0%	24.3%	Highly resistant
121	R1-26(17)	Chilli	0%	24.3%	Highly resistant
103	VAR 6-1	Chilli	0%	25.7%	Resistant
61	MC 4	Chilli	0%	26.8%	Resistant
123	NO.79	Chilli	0%	27.1%	Resistant
58	MC 4	Chilli	0%	28.6%	Resistant
108	BUKIT GAMBIR	Chilli	0%	28.6%	Resistant
36	CATIE 7798	Chilli	0%	30.0%	Resistant
43	80015	Chilli	0%	30.0%	Resistant
53	CATIE 7802	Chilli	0%	30.0%	Resistant
110	CP NO.6(CILI PADI)	Chilli	0%	30.0%	Resistant
62	MC 5	Chilli	0%	31.4%	Resistant
47	YOUNG CHIAO CHIAO	Chilli	0%	34.3%	Resistant
78	SWEET BANANA	Sweet	10%	34.3%	Resistant
112	ACC.45 IPCH3	Chilli	0%	34.9%	Resistant
83	PEPPER	Chilli	0%	35.7%	Resistant
86	SERRANO 1534 PAUL SMITH'S	Chilli	0%	36.5%	Resistant
99	PEPPER(Capsicum baccatum)	Chilli	0%	36.5%	Resistant
37	UNNAMED	Chilli	0%	38.6%	Resistant
105	PJ	Chilli	0%	38.6%	Resistant

續表4

Code	Variety (line)	Type	Wilt(%)	DI(%)	Resistant level
85	BASTIDON HDV	Chilli	10%	40.0%	Resistant
89	HAD 248	Chilli	0%	40.0%	Resistant
38	SERRANO CHILI	Chilli	20%	41.4%	Resistant
81	PEPPER	Chilli	0%	42.9%	Resistant
100	U 276	Chilli	0%	45.7%	Resistant
94	PEPPER	Sweet	30%	46.0%	Resistant
107	BUKIT GAMBIR	Chilli	0%	46.0%	Resistant
50	CH172-VERDE	Chilli	0%	48.6%	Resistant
113	ASSORTED RED	Chilli	0%	48.6%	Resistant
73	YOLO WONDER L	Sweet	20%	51.4%	Susceptible
91	PEPPER	Chilli	10%	51.4%	Susceptible
92	PEPPER	Sweet	0%	52.9%	Susceptible
80	PEPPER	Chilli	0%	54.3%	Susceptible
70	673 LADY BELL	Sweet	0%	57.1%	Susceptible
76	PEPPER	Chilli	0%	57.1%	Susceptible
84	PERENNINL HDV	Chilli	0%	57.1%	Susceptible
88	SERRAHO CHILI PVYRES	Chilli	20%	57.1%	Susceptible
40	PEPPER(Capsicum accatum)	Chilli	0%	58.6%	Susceptible
93	PEPPER	Sweet	0%	58.6%	Susceptible
64	NEW STAR	Sweet	20%	60.0%	Susceptible
69	671 HYBELLE	Sweet	10%	60.0%	Susceptible
39	OHYATSUBUSA	Chilli	0%	62.9%	Susceptible
77	SWEET BANANA	Sweet	0%	62.9%	Susceptible
82	AGRONOMICO NO.8	Sweet	30%	62.9%	Susceptible
115	CANAPE	Chilli	20%	62.9%	Susceptible
67	GYPSY	Sweet	0%	64.3%	Susceptible
95	PI 152225(Capsicum chinese)	Chilli	20%	64.3%	Susceptible
87	PEPPERONCINI	Sweet	50%	67.1%	Susceptible
48	672 HUNGARIAN WAX	Chilli	0%	67.3%	Susceptible
98	UNKNOWN	Chilli	10%	68.6%	Susceptible
90	PEPPER	Chilli	0%	71.4%	Susceptible
45	FARMERS NEWCOMER	Chilli	60%	72.9%	Susceptible
74	YOLO WONDER B	Sweet	70%	72.9%	Susceptible
65	RUBY KING	Sweet	60%	73.5%	Susceptible
66	BRUINSMA WONDER	Sweet	50%	74.3%	Susceptible
68	656 CALWONDER	Sweet	60%	77.1%	Highly susceptible
72	YOLO WONDER L	Sweet	70%	79.6%	Highly susceptible
101	DELGADO	Sweet	70%	81.4%	Highly susceptible

續表4

Code	Variety (line)	Type	Wilt(%)	DI(%)	Resistant level
116	QIEI MEN	Sweet	60%	81.4%	Highly susceptible
44	PEPPER	Sweet	40%	84.3%	Highly susceptible
71	673 LADY BELL	Sweet	70%	85.7%	Highly susceptible
75	CALIFORNIA WONDER 300(*TMR*)	Sweet	80%	90.0%	Highly susceptible

表 5. 不同類型番椒品種(系)在抗青枯病篩選的四個抗病等級中之品種(系)數

Table 5. The number of four resistance levels of different types of *Capsicum* spp. to *R. solanacearum*

Resistance level	Experiment 1		Experiment 2	
	Chili type of local commercial cultivar	Chili type of TARI inbreeding line	Chili type of National germplasm	Sweet type of National germplasm
Highly Resistant	0	3	28	0
Resistant	5	13	25	2
Susceptible	5	6	13	13
Highly susceptible	3	0	0	7

Screening of Peppers for Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum*[1]

Chien-Yih Lin[2], Shiow-Huey Hseu[3], San-Tai Wang[4], Shing-Jy Tsao[5], Jyh-Herng Yen[3] , and Chi-Hsiung Hsiao[4]

Summary

Two sets of pepper materials, totally 123 cultivars or lines, were screened for their resistance to bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* using a leaf-clip inoculation method. The first set of tested materials included 13 local commercial cultivars and 22 TARI inbreeding lines, which were all hot pepper type. Among them, the disease index of the lowest was 11.4% and the highest was 100%. The number of cultivars or lines rated as highly resistant, resistant, susceptible and highly susceptible were 2, 19, 11, and 3, respectively. The two highly resistant peppers were the inbreeding lines: '4207-5-37-4-2-2-5' and '4207-16-45-2-2-1-1', and the three highly susceptible peppers were all commercial varieties: 'Long Chili', 'New Comer', and 'Hungariana'. However, the commercial varieties, 'Smatra', 'Hot Beauty', 'Delicacy', 'Avon Eg', and 'Ever Flavor' showed resistance. The ratios of highly resistant, resistant, susceptible and highly susceptible among TARI inbreeding lines were 9.2, 63.6, 27.2, and 0%, respectively and the commercial varieties were 0, 38.5, 38.5, and 23%, respectively. This indicated that the TARI inbreeding lines were more resistant to bacterial wilt than the commercial varieties. The second set of tested materials were samples obtained from the Office of Plant Germplasm totally including 88 cultivars or lines of sweet and hot pepper types. Among these materials, the lowest disease index was 1.4% and the highest was 90.0%. The number of cultivars or lines rated as highly resistant, resistant, susceptible and highly susceptible were 28, 27, 26, and 7, respectively. The seven highly susceptible varieties(lines) were all sweet pepper type and the 28 highly resistant cultivars (lines) were all belonged to hot peppers.

Key words: *Capsicum* spp., bacterial wilt, resistance screening, *Ralstonia solanacearum*

---

1. Contribution No. 2002 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.
2. Director, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Respectively, Associate Plant Pathologist and Postdoctorad researcher of Department of Plant Pathology, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Respectively, Assistant Horticulturist and Senior Plant Breeder and Head, Department of Horticulture, TARI, Wufeng, Taichung , Taiwan, ROC.
5. Associate professor, Department of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.

48-4-0

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 84～95 (1999)

Study on Cross-resistance between BPU-type IGRs and Other Insecticides Including *Bacillus thuringiensis* and Abamectin in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L.[1]

Ching-Hua Kao and Edward Y. Cheng[2]

Abstract: Investigation of cross-resistance of diamondback moth(DBM), *Plutella xylostella* L., which resisted to benzoylphenyl urea(BPU)-type insect growth regulator (IGR), among four organophosphorus insecticides, two carbamates, two synthetic pyrethroids, four IGRs, Thuricide and Abamectin was conducted in this study. The IGR-selected strains did not show strong cross-resistance to test insecticides except carbofuran. A relatively high resistance to synthetic pyrethroids was recorded as synthetic pyrethroid resistance of the DBM is an existing phenomenon in Taiwan. All IGR-resistant strains were still highly sensitive to Thuricide and Abamectin. Cross-resistance among different IGRs is significant in different amplitudes. Hexaflumuron was the least affected by IGR cross-resistance and followed by chlorfluazuron, while flufenoxuron and teflubenzuron confronted with the most serious cross-resistance problem. The IGR-resistance in DBM is chemical structure-related. Analyses of structure-activity relationship in both susceptible and resistant strains indicated both 3,5-dichloro- and a large side moiety at position-4 on the phenyl ring of BPU are beneficial to reduce the IGR-resistance in DBM.

Key words: *Plutella xylostella*, Cross-resistance, Benzoylphenyl urea , Insect growth regulator, Insecticides.

---

1. Contribution No. 2003 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.
2. Respectively, Assistant Entomologist and Senior Entomologist, Department of Applied Zoology, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.

INTRODUCTION

In recent years, developing safer insecticide is a major goal for pesticide industry, and critical physiological development stage of arthropods becomes the target for new insecticide design. The development of benzoylphenyl urea (BPU)-type insect growth regulator (IGR) served as a successful example since its action is targeted on molting, which is a specific phenomenon in arthropods. Diflubenzuron is the first product of this new category of insecticide particular effective in dipterous pests. Many researchers reported that different chemical analogues of IGRs affect differently in various insect species. Consequently, compounds with specific action on lepidopterous such as teflubenzuron were developed later.

For the control of diamondback moth (*Plutella xylostella*, DBM), teflubenzuron is the first successful IGR, and followed by chlorfluazuron. Both compounds have gained early success in DBM control. Unfortunately, the rapidly developed IGR-resistance of the DBM had rendered the effectiveness of teflubenzuron to minimum when the control effect of chlorfluazuron was also decreased significantly. Evidences suggested that the major mechanism for IGR-resistance is stemmed from a newly induced mixed function oxidase (MFO) [3], which has no relation to the MFOs responsible for the existing resistance of synthetic pyrethorids and carbamates.

Before 1988, studies on both laboratory and field strains of DBM showed no evidence that traditional insecticides would cause cross-resistance to IGRs [5,11]. The early success of IGR on DBM control in Taiwan also practically confirmed no cross-resistance from other insecticides. IGR-resistance in DBM is originated from a new and induced MFO complex [3], but whether there is cross effect of IGR-resistance on other insecticides is unclear. Besides, whether the IGR-resistance is a universal response or just specific to individual IGR in DBM is also unknown. The above information is needed in DBM resistance management. The purpose of this study is tried to clarify both questions.

MATERIALS AND METHODS

Insecticides used:

Four IGRs used in this study were chlorfluazuron (CFA), 5% EC (Ishihara Sangyo Kaisha Limited); teflubenzuron (TFB), 15% SC (Celamerck GmbH & Co. KG); hexaflumuron (HXF), 10% EC (DowElanco) and flufenoxuron (FFO), 10% EC (Shell International Chemical Company Limited).

Commercial insecticides used for comparison were methomyl 90% WP, carbofuran 40.64% FP, mevinphos 25.3% EC, methamidophos 50% EC, phenthoate 50% EC, profenofos 43% EC, cypermethrin 5% EC, fenvalerate 20% EC, Abamectin® 2% S and Thuricide® 3% WP.

Field IGR selection of resistant DBM:

Four separate fields were chosen for individual IGR-resistant DBM selection. The resistance was expected after intensively spraying IGRs for 12 months, a period for previously recorded IGR-resistance development in DBM of Taiwan [3]. The spraying schedule was set on a 10-day interval and the doses used in selection were based on or equivalent to that of the already registered CFA and TFB as follows:

(1) CFA 5% EC in 2,000X dilution
(2) TFB 15% SC in 4,000X dilution
(3) HXF 10% EC in 4,000X dilution
(4) FFO 10% EC in 4,000X dilution

Each field site was divided into two parts, and cruciferous vegetables were planted in the half-field alternatively to maintain a continuous DBM population. The selection site was at least 1 kilometer separated from other vegetable fields by rice paddy. Inundate release of the susceptible DBM in selection site had been done in the early stage of selection to reduce the impact of possible invasion of field IGR-resistant DBM.

Insects used:

Three field-collected resistant DBM strains[2] and 4 field IGR-selected DBM strains were tested against a

native susceptible DBM strain, and they were:

I. Susceptible strain：Taiwan native I-lan (IL) DBM strain.

II. Resistant strains:

i. Field-collected IGR-resistant DBM strains

A. RS1 - with previous TFB usage record

B. RS2 - with previous TFB and CFA resistance record

C. RS3 - with previous CFA usage record

ii. Field IGR-selected DBM strains

A. R-CS - selected by CFA only

B. R-TS - selected by TFB only

C. R-HS - selected by HXF only

D. R-FS - selected by FFO only

Bioassay methods:

I. Spray tower method: The susceptibilities of DBM to methomyl, carbofuran, mevinphos, methamidophos, phenthoate, profenofos, cypermethrin and fenvalerate were tested as described in Cheng *et al.*[1]. One milliliter of insecticide solution was transferred into the holding tube of Burkard Potter Spray Tower and sprayed on leaf disc. After air-dried, the leaf disc was inverted and loaded with fifteen third instar DBM larvae, and sprayed with another milliliter of the same insecticide solution. Treated larvae and leaf discs were transferred into the petri dish, and total of 60 larvae in 4 subsets was treated for each dosage. The post-treatment holding condition was controlled at 25°C in a constant temperature growth chamber. The leaf discs used were 24 cm^2 and changed to fresh untreated leaf discs at the end of 48 hours, hence the IGR-treating period was fixed at 48 hours.

II. Leaf dipping method: The susceptibilities of different DBM strains to Abamectin, Thuricide, CFA, TFB, FFO and HXF were determined as described by Cheng and Kao[2,9], and the IGR dipping solutions were diluted at concentration increment of 10-fold for the susceptible strain as follows:

CFA - 1.67, 0.167, 0.0167 and 0.00167ppm
TFB - 5.00, 0.500, 0.0500 and 0.00500ppm
FFO - 3.33, 0.333, 0.0333 and 0.00333ppm
HXF - 3.33, 0.333, 0.0333 and 0.00333ppm

In testing resistant DBM strains, the dilutions were also set at 10-fold increment for IGRs except HXF.

CFA - 500, 50, 5 and 0.5ppm
TFB - 1,500, 150, 15 and 1.5ppm
FFO - 1,000, 100, 10 and 1.0ppm
HXF - 64, 16, 4 and 1.0ppm

Cabbage leaves were washed and air-dried first, and leaves were punched into discs of 3.5 cm in diameter. Total of 20 leaf discs were prepared for each dosage and leaf discs were dipped for 5 seconds in IGR solutions containing 333ppm Triton X-100 and left to air-dry. For the control test, cabbage leaf discs were dipped in a 333ppm Triton X-100 solution only and air-dried on wire rack. In each petri dish, three leaf discs were used in the beginning and 15-20 third instar DBM larvae were put onto the treated leaves. At 48 hours after treatment, these leaf discs were discarded and changed to the other two treated leaf discs that been stored at 5°C until pupation. Total of sixty DBM larvae in 4 subsets for each dosage were subjected to treatment.

Assessments:

Mortality assessments of DBM to methomyl, carbofuran, mevinphos, methamidophos, phenthoate, profenofos, cypermethrin and fenvalerate were made 48 hours after the spray tower treatment. For Abamectin and Thuricide, the mortalities were recorded at 24, 48, 72, 96 and 120 hours, the same as those for IGR, after the start of treatment. Analysis was made by correcting with the control first, then analyzed by Probit analysis[8]. If the mortality in control was over 8%, the test was abandoned and repeated.

RESULTS

In an early study, we had reported TFB and CFA were very effective in controlling the multiple resistant DBM, which is resistant to organophosphorus compounds, carbamates and synthetic pyrethroids[5]. By 1988, IGR were still effective against DBM and suffered no cross-resistance from any known insecticides. In Taiwan, the field DBM has developed resistance to IGR during March 1988 to early 1989, and the resistance ratios were 200 and 115 fold for TFB and CFA between the resistant and the susceptible strains, respectively[3].

Table 1. Susceptibilities of the susceptible and individually BPU-selected DBM strains to 10 insecticides

Insecticides	LC_{50} (ppm) and slope				
	S-IL	R-CS[Z]	R-TS	R-HS	R-FS
Organophosphorus compounds					
Mevinphos					
LC_{50}	165.8	356.9	515.3	611.5	732.2
Slope	3.08	2.70	3.11	3.42	4.46
Methamidophos					
LC_{50}	350.7	947.8	1387.5	1665.8	2959.4
Slope	3.02	2.88	5.10	3.35	3.85
Phenthoate					
LC_{50}	283.9	1360.5	1606.6	3236.2	750.5
Slope	1.46	1.19	0.74	0.71	0.65
Profenofos					
LC_{50}	172.4	963.1	3245.8	1213.1	2107.5
Slope	0.95	1.19	2.19	2.22	2.57
Carbamates					
Methomyl					
LC_{50}	793.1	6281.1	4265.4	7294.5	11110.9
Slope	1.85	1.59	2.40	3.86	2.13
Carbofuran					
LC_{50}	91.0	7114.6	16889.5	15625.6	7213.9
Slope	1.08	0.95	0.74	1.12	1.63
Synthetic pyrethroids					
Cypermethrin					
LC_{50}	41.0	569.3	819.3	499.4	415.9
Slope	0.68	1.62	1.88	2.79	3.30
Fenvalerate					
LC_{50}	41.0	3607.3	1608.4	1731.7	872.9
Slope	0.66	1.05	1.31	2.32	2.02
Bioinsecticides					
Abamectin					
LC_{50}	0.002	0.009	0.028	0.005	0.007
Slope	1.53	1.05	1.71	1.43	1.11
Thuricide					
LC_{50}, in d.f.[Y]	$4x10^{-5}$	$6.3x10^{-5}$	$9x10^{-5}$	$10.3x10^{-5}$	$4.4x10^{-5}$
Slope	2.05	0.80	1.81	1.42	0.70

[Z] R-CS: chlorfluazuron-selected resistant strain; R-TS: teflubenzuron-selected resistant strain; R-HS: hexaflumuron-selected resistant strain; R-FS: flufenoxuron-selected resistant strain.
[Y] d.f.= dilution factor.

The cross-resistance of IGR to other insecticides and IGRs can only be understood by testing the IGR-selected DBM. The wild IGR-resistant DBM were also tested for cross-resistance effect among different IGRs to verify the results of IGR-selected DBM. After selecting for one year, the susceptibilities of 4 individual IGR-selected DBM

strains to 10 commonly used insecticides from 4 categories were summarized in Table 1. The resistance ratios were calculated with respect to the susceptible IL-strain in Table 2.

Table 2. Resistance ratios of 4 individually BPU-selected DBM strains to 10 insecticides

	Resistance ratio (R.R.)			
	R-CS[z]	R-TS	R-HS	R-FS
Organophosphorus compounds				
Mevinphos	2.2	3.1	3.7	4.4
Methamidophos	2.7	4.0	4.7	8.4
Phenthoate	4.8	5.7	11.4	2.6
Profenofos	5.6	18.8	7.0	12.2
Carbamates				
Methomyl	7.9	5.4	9.2	14.0
Carbofuran	78.2	185.6	171.7	79.3
Synthetic pyrethroids				
Cypermethrin	13.9	20.0	12.2	10.1
Fenvalerate	88.0	39.2	42.2	21.3
Bioinsecticides				
Abamectin	4.5	14.0	2.5	3.5
Thuricide	1.6	2.3	2.6	1.1

[z] Footnotes the same as in Table 1.

For the organophosphorus compounds, the resistance level (2.2-18.8) is similar to those field strains observed previously[(1,4)]. Hence the cross-resistance from IGR to organophosphorus compound is rather unlikely. For the carbamates, methomyl resistance in DBM is usually higher than carbofuran resistance[(4)]. However, all IGR-selected strains showed higher carbofuran resistance than methomyl (Table 2). Fahmy *et al.*[(6)] had reported that no cross-resistance from IGR to other insecticides and we have also confirmed that carbofuran resistance in LC-strain is not cross to IGRs, but the IGR-resistance seemed to have a strong cross-resistance to carbofuran. Both IGR and carbofuran confront with MFO-generated resistance[(5)]. It seems that IGR-induced MFO has wider substrate spectrum than the MFO induced by carbofuran. However, carbofuran has been excluded from rotation for DBM resistance management in Taiwan because it induces resistance easily as well as its toxicity to human and non-target organisms is high.

In IGR-selected strains, the resistance to synthetic pyrethroids is strong and the resistance ratios for fenvalerate and cypermethrin are 21.3-88.0 and 10.1-20.0 fold, respectively (Table 2). The resistance is similar to those previously observed synthetic pyrethorids resistance in field DBM[(4)] indicating that IGR-resistance has no special impact on the synthetic pyrethorids resistance although both resistances are MFO-originated. The results in Table 2 showed no cross-resistance from IGRs to Thuricide or Abamectin, which agreed with the conclusion of Fauziah and Wright[(7)].

In regard of the IGR-resistance, although HXF and FFO had never been used in Taiwan, both had confronted with resistance problem in the field strains (RS1 - RS3 in Tables 3 and 4). The cross-resistance test of 4 IGRs in four

BPU-selected DBM strains were presented in Table 5. The IGR-resistance in each selected strain is not specific to its inducing compound, and a rather general trend of compound-related resistance is observed. In all IGR-selected strains, TFB suffered the worst resistance (Tables 5 and 6) and the followed by FFO, CFA and HXF. Similar result was observed in 3 wild resistant strains (Tables 3 and 4).

Table 3. The LC_{50}s (in ppm) and slopes of the susceptible DBM and 3 wild resistant strains to 4 BPUs

	S-IL	RS1	RS2	RS3
CFA				
LC_{50}	0.12	5.62	4.01	46.20
Slope	0.84	0.85	0.65	0.72
TFB				
LC_{50}	0.13	41.70	9.93	85.00
Slope	0.86	0.54	0.65	0.47
HXF				
LC_{50}	0.24	3.98	5.74	10.90
Slope	0.99	1.43	1.40	1.38
FFO				
LC_{50}	0.23	15.10	11.40	192.30
Slope	0.97	0.58	0.61	0.48

Table 4. Resistance ratios of 3 wild resistant DBM strains to different BPUs

	RS1	RS2	RS3	Average
Resistance ratio (R.R.)				
HXF	16.4	23.7	45.1	28.4
CFA	47.1	33.6	387.1	155.9
FFO	64.5	48.9	822.1	311.8
TFB	322.3	76.7	656.5	318.5
Resistance relative to HXF				
HXF^{z}	1.00	1.00	1.00	1.00
CFA	2.87	1.42	8.58	4.29
FFO	3.93	2.06	18.23	8.07
TFB	19.69	3.24	14.56	12.48

^{z} R.R. of HXF is 28.4.

A general conclusion has been reached for both wild resistant and IGR-selected strains that HXF is the least affected by IGR-resistance. When we set the susceptibility of HXF in each strain as the index of 1, the relative resistance were obtained in the second part of Table 4 (1:4.29:8.07:12.48) and Table 6 (1:3.28:7.27:21.97). By comparing any two IGRs in both wild and IGR-selected strains, the relative effective dosages are calculated in Table 7. All these results indicated the existing cross-resistance amongst different IGRs and the degree of resistance is a compound-dependent phenomenon among IGRs. The IGR cross-resistance was demonstrated between CFA and TFB in DBM by Fauziah and Wright[7] and Fahmy *et al.*[6]. In this study, the resistance to FFO (Table 5) was high and almost equivalent to that of TFB, which was different from the result of Fauziah and Wright[7]. On the other hand, HXF suffered the least IGR-resistance, which was partially agreed with the test reports of Fauziah and Wright[7] and Kobayashi *et al.*[10].

Table 5. The LC_{50}[S] and slopes of the susceptible DBM and 4 individually BPU-selected field strains to BPUs

Insecticides	LC_{50} (ppm) and slope				
	S-IL	R-CS[Z]	R-TS	R-HS	R-FS
CFA					
LC_{50}	0.12	67.20	26.00	1.50	3.90
Slope	0.84	0.53	0.70	0.55	0.62
TFB					
LC_{50}	0.13	126.00	123.10	92.10	115.00
Slope	0.86	0.45	0.44	0.57	0.52
HXF					
LC_{50}	0.24	16.20	17.90	5.90	6.90
Slope	0.99	1.07	0.75	1.85	0.81
FFO					
LC_{50}	0.23	144.10	88.20	1823.20	50.30
Slope	0.97	0.50	0.36	0.38	0.41

[Z] Footnotes the same as in Table 1.

Table 6. Resistance ratios of 4 individually BPU-selected DBM strains to different BPUs

	R-CS[Z]	R-TS	R-TS	R-FS	Average
Resistance ratio					
HXF	66.9	74.0	24.5	28.5	48.5
CFA	564.7	218.5	12.6	32.8	207.2
FFO	615.8	376.9	-	215.0	402.6
TFB	976.7	954.3	714.0	891.5	884.1
Resistance relative to HXF					
HXF[Y]	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
CFA	8.4	3.0	0.5	1.2	3.3
FFO	9.2	5.1	-	7.5	7.3
TFB	14.6	12.9	29.1	31.3	22.0

[Z] Footnotes the same as in Table 1.
[Y] R.R. of HXF is 48.5

Table 7. Effective dosage equivalence of BPUs in resistant DBM strains

2nd BPU/1st BPU	Relative effective dosage[Z]	
	Wild strains	Individually BPU-selected strains
CFA/HXF	3.20	4.29
FFO/HXF	7.20	8.07
TFB/HXF	22.00	12.48
FFO/CFA	2.25	1.88
TFB/CFA	6.88	2.91
TFB/FFO	3.06	1.55

[Z] No significant difference between wild and BPU-selected strains was found, but cross-resistance among BPUs is significant.

DISCUSSION AND CONCLUSION

It has been concluded in earlier study[4] that the resistance from other insecticides have no cross effect on BPU-type IGRs in DBM, and the IGR-induced resistance has no cross effect to organophosphorus compounds, synthetic pyrethroids, 2 bio-insecticides and carbamates except carbofuran. Other than the strong cross-resistance to carbofuran, the lack of cross-resistance amongst IGRs, carbamates and synthetic pyrethroids confirmed those induced MFOs in DBM are very diverse in their specificity[4].

A common IGR-resistance among IGRs is confirmed in this study. The only difference among IGRs is the compound-dependent amplitude in resistance, which is strongly related to the molecular structure of IGRs. The phenomenon is rather clear since earlier developed IGRs such as diflubenzuron and triflumuron are not active in lepidopterous pests like DBM. By modifying the chemical structure, TFB and three other tested IGRs showed effective activity. The structure specificity of IGR molecular not only affects the ability of activity but also extends to their degradation in DBM. Metabolic study will clarify how the chemical structures of IGRs affect their biological activity as well as their MFO degradation.

Combining the information of previous study in the susceptible DBM[2,5], equivalent dosages were estimated at 3,715 : 435 : 1 : 1 : 2 : 2 for diflubenzuron : triflumuron : TFB : CFA : FFO : HXF. After adding the synergist PB to inhibit the activity of natural, not induced, MFO for diflubenzuron and triflumuron, the equivalent dosages changed to 234 : 180 : 1 : 1 for diflubenzuron : triflumuron : TFB : CFA[5]. The needed dosages of diflubenzuron and triflumuron were still too high, hence they were recognized as non-effective IGRs for DBM, while CFA and TFB were considered as effective. HXF and FFO were not tested in the study of Cheng *et al.*[5], but their effective dosages were in the same range of CFA and TFB[2]. In other words, when there is no interference from resistance, 4 effective IGRs can be considered ideal in their molecular design and fit to function as insect growth regulators for DBM.

In field-collected IGR-resistant strains (RS1, RS2 and RS3) that had been exposed to CFA and TFB, the effective dosages of 4 IGRs had changed drastically and HXF suffered the least resistance. By fixing the resistance of HXF as index of 1.0, the relative resistance strength of other IGR can be calculated (Table 6). The relative insecticidal efficacy between any two IGRs were then compared in Table 7.

To examine the structure-activity relationship, the equivalent dosages and the chemical structures of 6 IGRs were listed and compared in Fig. 1. In the susceptible strain, it is clear that the side moieties in positions -2, -3, -5 and -6 of phenyl ring caused significant difference between 4 effective and 2 non-effective IGRs. Less complicated diflubenzuron and triflumuron with unoccupied positions -2, -3and -5 (Fig. 2) of phenyl ring were more susceptible to the metabolism of natural MFO, and were also not very effective even with the help of PB. In 4 effective IGRs, the bio-activity of individual side moiety on phenyl ring is rather indistinguishable in the susceptible DBM.

In the resistant strains, various combinations of side moieties on phenyl ring caused significant resistance difference. If we compared the phenyl ring with all the side moieties of 4 effective IGRs illustrated in Fig. 2, position-2 is either unoccupied or occupied by a fluoro- moiety, while positions-3 and -5 are either unoccupied or occupied by a 3,5-dichloro- substitute. Nevertheless, position-4 varied from a fluoro- moiety, a ring structure with side moieties, to a tetrafluoroethoxy chain.

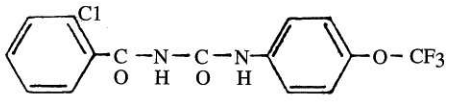
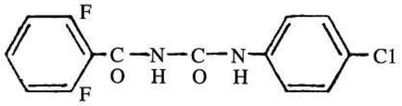
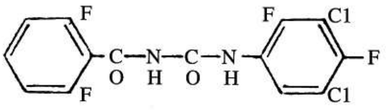
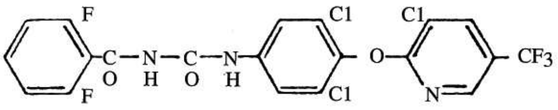
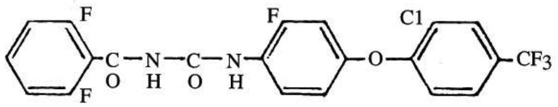
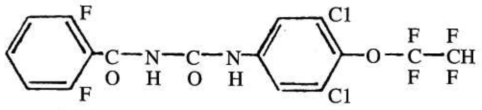
Chemical structures	Compound names	Equivalent dosage	
		Without PB	With PB
	Triflumuron	435	(180)
	Diflubenzuron	3,715	(234)
	Teflubenzuron	1	-
	Chlorfluazuron	1	-
	Flufenoxuron	2	-
	Hexaflumuron	2	-

Fig. 1. Comparison of chemical structures and equivalent dosages (LC_{50} in ppm) for 6 BPUs against the susceptible diamondback moth.

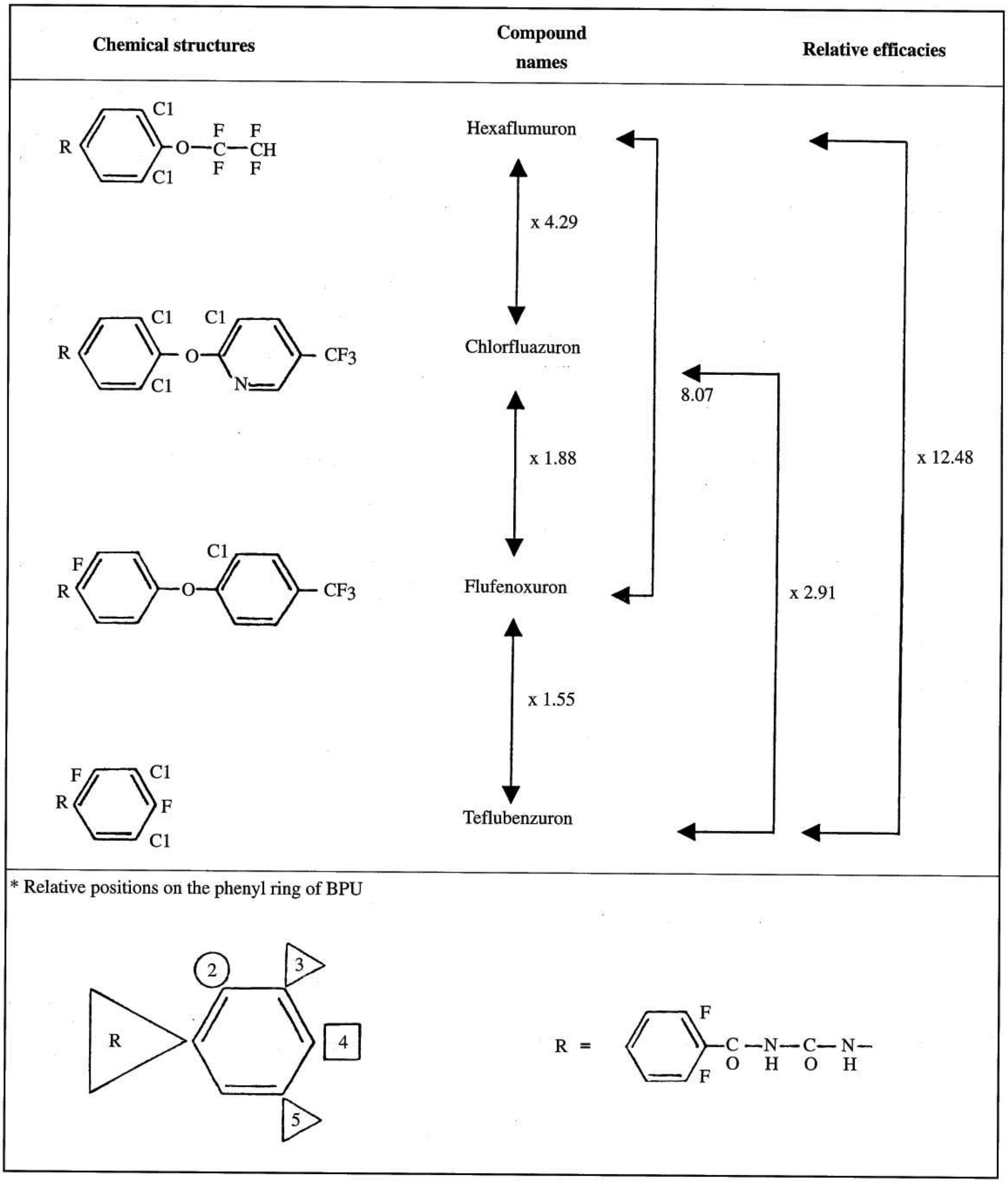


Fig. 2. Relative efficacy between any two BPUs in resistant DBM strains.

A large side moiety at position-4 combined with the 3,5-dichloro-moiety can probably reduce the resistance to a lesser extend as both HXF and CFA demonstrated (Table 7). For individual comparison, the tetrafluoroethoxy chain of HXF performed better than the heterocyclic ring of CFA against the IGR-resistance in DBM. Without the 3,5-dichloro-structure, FFO met high IGR-resistance despite its structural similarity to CFA. With the 3,5-dichloro- structure but lacking a large side moiety at position-4, TFB also confronted with high resistance. The resistance difference between HXF and TFB reached 12.5 fold and the tetrafluoroethoxy chain at position-4 might be the major cause. The 2-fluoro-moiety did not cause much difference in resistance as both HXF and CFA lacked it.

By keeping the 3,5-dichloro-moiety on phenyl ring and making further modification on the side chain of position-4, chemists of pesticide industry may be able to synthesize better BPUs to counter the IGR-resistance problem in DBM.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Dr. R. Dutton, Dr. S. Uk, Dr. H. Buholzer and Dr. D. C. Twinn of the Field Crops and Vegetable Working Group, IRAC for their support and comments on this study. Thanks also due to Ms Su-bay Jean and Yen-ling Lu for their assistance in testing and insect rearing.

REFERENCES

1. Cheng, E. Y., Chou, T. M., and Kao, C. H. 1985. Insecticide-resistance study in *Plutella xylostella* (L.) VI. An experimental analysis of organophosphorus and synthetic pyrethroid resistance. J. Agric. Res. China 34: 96-104.
2. Cheng, E. Y., and Kao, C. H. 1998. Validation of a field monitoring system for BPU-type IGR resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella* - Presumed working scheme based on IRAC Method No. 7 (leaf dipping method). J. Agric. Res. China 47:142-158.
3. Cheng, E. Y., Kao, C. H., and Chiu, C. S. 1990. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. X. The IGR-resistance and the possible management strategy. J. Agric. Res. China 39: 208-220.
4. Cheng, E. Y., Kao, C. H., Lin, D. F., and Tsai, T. C. 1986. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. VIII. The specificity of oxidative detoxication mechanism in larval stage. J. Agric. Res. China 35: 375-386.
5. Cheng, E. Y., Lin, D. F., Tsai, T. C., and Kao, C. H. 1988. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. IX. The selective metabolism of insecticides. J. Agric. Res. China 37: 328-339.
6. Fahmy, A. R., Sinchaisri, N., and Miyata, T. 1991. Development of chlorfluazuron resistance and pattern of cross-resistance in the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Pestic. Sci. 16: 665-672.
7. Fauziah, I., and Wright, D. J. 1991. Cross-resistance between acylurea insect growth regulators in a strain of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) from Malaysia. Pestic. Sci. 33: 359-370.
8. Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge University Press, London. 333 pp.
9. Kao, C. H., and Cheng, E. Y. 1994. The resistance and cross resistance of diamondback moth, *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* in Taiwan. J. Agric. Res. China 43: 425-432.
10. Kobayashi, S., Aida S., Kobayashi, M., and Nonoshita, K. 1992. Resistance of diamondback moth to insect growth regulators, pp. 383-390. In: N. S. Talekar, ed. Proceedings, Second International Workshop on Diamondback Moth and Other Crucifer Pests, December 10-14, 1990, Tainan, Taiwan.
11. Perng, F. S., Yao, M. C., Hung, C. F., and Sun, C. N. 1988. Teflubenzuron resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 81: 1277-1282.

小菜蛾對BPU類生長調節劑及其他殺蟲劑交互抗性之研究[1]

高靜華　鄭　允[2]

摘要：本研究測試抗benzoylphenylurea(BPU)類生長調節劑之小菜蛾對有機磷劑、氨基甲酸鹽劑、合成除蟲菊精、BPU 類生長調節劑、蘇力菌及阿巴汀是否具有交互抗性。結果顯示，以 BPU 類生長調節劑篩選之品系對加保扶有交互抗性。抗BPU類生長調節劑之小菜蛾品系對其他受測藥劑均不具交互抗性，且對蘇力菌及阿巴汀之感度仍極高。BPU類中不同的生長調節劑間則具交互抗性，惟程度不一，其中，hexaflumuron 受交互抗性之影響最小，其次為 chlorfluazuron，而 flufenoxuron 與 teflubenzuron 則有極嚴重之交互抗性。此一現象在田間抗 BPU 類生長調節劑之品系，及以單劑汰選出之抗性品系均相同。而於田間篩選抗性時，則以已在本省登記之chlorfluazuron及 teflubenzuron 較 flufenoxuron 及 hexaflumuron 快速，可能與前兩項藥劑已在台灣使用有關。再由BPU類生長調節劑之化學結構，以及感、抗性品系之測試結果分析推測，BPU類生長調節劑 phenyl-環上之 3,5-dichloro-結構與位置4上之大型鍵結側基(moiety)，可降低小菜蛾對 BPU 類生長調節劑之抗性程度。

關鍵詞：小菜蛾、BPU類生長調節劑、殺蟲劑、抗藥性、交互抗性。

1. 行政院農業委員會農業試驗所　研究報告第 2003 號。
2. 本所應用動物系助理研究員及研究員。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 48(4) 96～110 (1999)

應用影像處理技術分析噴霧覆蓋率之研究[1]

邱相文[2] 李芳繁[3] 梁連勝[2]

摘要：本研究是利用影像處理技術進行分析噴霧覆蓋在水試紙上的分佈情形，並以影像掃描器作爲取像設備而進行分析。水試紙常被用爲噴霧效果的檢測材料，本研究也利用水試紙來收集噴霧沉積分佈之情形，並以影像掃描器將霧粒沉積分佈之影像資料加以數位化，然後以影像處理技術進一步分析。影像處理過程包括使用分界值法來進行霧粒與水試紙背景的分割，以及利用標記法來計算霧粒影像的面積、個數等參數。接著便可利用影像處理所得到的數值以求得霧粒沉積覆蓋率。應用影像處理技術分析噴霧沉積後的水試紙樣本試驗結果顯示，噴霧沉積覆蓋率會隨著施噴壓力的增加而增加，且會隨著噴灑高度及噴霧行進速度的增加而減少。利用影像技術來分析噴霧沉積的情形不但精確、快速、節省大量的人工操作勞力和時間，更可以數值化及數位化影像來描述噴霧沉積情形，可避免人爲視覺判讀上的誤差的主觀意識判斷上的差異。

關鍵詞：影像處理、噴霧沉積覆蓋率、附著度。

前　　言

本省地處亞熱帶，終年高溫多雨，雖適合作物的生長，但也是昆蟲及其它病菌的溫床。因此，病蟲害的防治工作已成爲農業生產上不可缺少的一環。目前氣體輔助式噴藥法及靜電式噴藥法則是爲能增加霧粒附著度和降低霧粒飄移的目的而被引用的新噴藥技術[(2)]，爲了要量測分析各種類型的噴藥機械之噴藥效果，霧粒粒徑大小的分佈、附著度、均勻度、單位面積內的霧粒數目、沉積覆蓋率與霧粒穿透作物叢之能力等參數的分析便成爲重要的噴霧效果評估指標[(13)]。

一般使用之人工標的物(搜集器)有K卡、濾紙、搜集索、塑膠片、水試紙與尼龍網等，而使用之分析技術有螢光顯跡劑作殘留回收分析、標準比對法、銅劑回收比色法與鹽劑回收比導電度法等[(8,9,10,11,12,13)]。本研究應用較簡便有效的水試紙來搜集霧粒的沉積量[(5)]。目前水試紙的噴霧品質判讀常用人工視覺進行外觀比對及霧粒數目的人工計數。然而水試紙上噴藥沉積的判讀是一種冗長乏味的工作，過程不但費時費力，而且人工的判讀不但主觀且容易產生誤差。因此本研究便應用數位影像處理的技術來量測分析噴霧沉積分佈形態並建立數量化之量測技術。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所 研究報告第 2004 號
2. 本所農工系助理、研究員兼系主任。台灣省 台中縣 霧峰鄉。
3. 國立中興大學農業機械工程系教授。台灣省　台中市。

材料與方法

一、材料

本研究為收集噴霧沉積情形，使用美國系統噴霧公司(Spraying Systems Co.)之Teejet XR11002VS扇形壓力式噴頭，運用高壓幫浦(鑽石牌，TS-22型)將液體壓送至噴頭，並在管路中連接壓力表(PSI-TRONIX)以監控施噴壓力。在噴頭下方用水試紙(water sensitive paper，26×76㎜, Spraying Systems Co.)收集不同實驗條件下的噴霧沉積分佈形態。

為了模擬噴霧機在田間噴霧時之行進速度，本實驗設計使噴霧裝置定置而使目標物行進之相對運動方式模擬噴霧機之田間行進噴霧作業情形。本裝置利用變速馬達配合皮帶輪及三角皮帶之傳動，並將一支長2公尺的長桿固定在轉軸上作圓周運動，水試紙則夾在長桿的最外端邊緣處，使長桿迴轉時水試紙剛好位於噴頭的正下方而能收集到由噴頭所霧化的噴霧。模擬之田間行進速度可用下式來計算：

$$V=2\pi R\times N\times 60\times 10^{-3}$$

其中

V為田間行進速度，單位為km/hr。

N為帶動長桿之最後傳動軸轉速，單位為rpm。

R為長桿旋轉中心至端點之距離，單位為m。

霧粒沉積情形的資料收集是使用Spraying Systems公司所製造的水試紙，其尺寸為76×26㎜，在上述之試驗中取得水試紙後，便可用EPSON GT-6500影像掃描器連接個人電腦來進行取像，取像方法是在每張水試紙上隨機擷取3次一長寬為40㎜×20㎜大小的面積的資料進行影像研究，影像分析處理係是利用Ad Oculos 3.0影像分析軟體進行影像的各種處理與演算。

二、方法

應用水試紙檢測藥液覆蓋率時，是先將水試紙放置於試驗設計上的特定位置上，噴藥試驗後需馬上將水試紙取下，讀取上面的影像資料並加以存檔，以供後續分析之用，所應用的研究方法如下所述。

(一)噴霧試驗方法

本試驗使用Teejet XR11002VS扇形噴頭，運用高壓幫浦將液體壓送至噴頭，而在噴頭下方用水試紙收集不同實驗條件下的噴霧沉積分佈形態，進行影像分析研究，試驗方法示意圖如圖1所示。

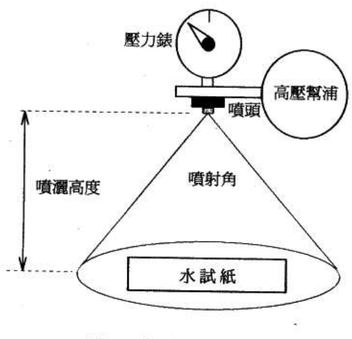


圖 1. 噴霧試驗方法亦意圖。

Fig.1. The diagram of spraying test mathod.

(二)噴霧試驗參數之設定

液體霧化後霧粒之沉積情形受到許多因素的影響如噴頭型式、液體壓力、密度等，霧粒沉積情形更會受到噴灑高度及噴霧機行進速度之影響，本實驗爲了求取各種噴霧條件下的沉積情形，設計了表1的參數進行試驗：

表1. 試驗參數之設定值

Table 1. Setting values of tested parameters

液體壓力 (kg/cm^2)	噴頭流量 (L/min)	噴霧高度 (cm)	田間模擬行進速度 (km/hr)
2	0.64	50	3.27
5	0.91	80	6.54
8	1.18	110	9.82

(三) 水試紙影像資料之擷取

影像處理技術在農業上的應用因農產品形狀的關係，一般擷取影像的方法大部份採用CCD攝影機來擷取物體影像，將其數位化後再進行影像資料分析研究[1]。因此應用CCD攝影機取像環境的設定是非常重要的工作，如照明亮度、背景顏色、鏡頭焦距、取像高度等因素都會影響處理的結果。本試驗因樣本爲平面狀的水試紙，所以可以應用影像掃描器來作爲影像擷取設備，將變色的水試紙上的藥劑霧粒分佈情形的資料掃描儲存爲數位影像資料進行分析研究。一幅數位影像是影像點f(x,y)在空間座標和亮度上都數位化後的影像。可以把數位影像看成一個矩陣，它的行和列值確定了影像中的一個點，而對應的矩陣元素值就是該點的灰階。這樣的數位陣列的元素稱爲影像元素(image elements)、圖片元素(picture element)或像素(pixel)[7]。

霧粒沉積情形的資料收集是使用Spraying Systems公司所製造的水試紙，其尺寸爲76×26㎜。噴霧實驗後所收集到的水試紙樣本就可在影像掃描器上進行取像，取像方法是在水試紙上隨機擷取一長寬爲40㎜×20㎜大小的面積範圍內的資料進行影像研究分析，在同樣一張水試紙上進行三次重複的取樣程序。

運用影像處理方法來量測物體投影面積之前必須要先作影像校正，方法是先取得一已知面積的物體，然後用掃描器掃描並計算該物體所佔的影像像素總數及所運算出的影像面積，計算面積和實際面積的比值即爲面積校正係數，因此霧粒影像所演算出的面積乘上校正係數即可得到實際的霧粒面積，本研究中的像素面積校正值爲1pixel代表1.794 μm^2。

(四)影像分割

爲了能將水試紙上面的藥液斑點與未變色的背景分開，並降低雜訊的產生，必須要選取適當的影像分割值。影像分割常用的方法爲二值化處理，二值化處理的效果取決於分界值的選擇。對一張物體較背景明亮的影像而言，分界值過大，雖然可以減少雜訊的出現，但相對的有些屬於物體的像素可能會被割掉，造成實測面積減小及外形輪廓不夠完整。相反的，若將分界值取的太小，可能造成雜訊過多，將會在往後的計算上產生誤差。分界值的取決常用的方法是直接觀察統計直方圖(histogram)的分佈情形。

本研究使用分界值法(thresholding)進行影像分割，其主要的目的是要獲得一個二值化的影像而從其中獲得我們所需要的資料。噴霧微粒變色影像與背景的灰階分佈不同，若將霧粒影像以統計圖法將其灰階分佈圖畫出，如圖2所示之情形，統計圖的橫軸是代表0－255的灰階值，縱軸代表對應的像素

點數。

使用不同的分界值將使霧粒影像樣本具有不同之霧粒尺寸與背景，也會影響整體分析之準確度，人爲主觀地去選定分界值來分割影像地物體與背景通常造成5%以上的誤差，若是經過一個已知霧粒沉積分佈資料如覆概率、霧粒粒徑、霧粒數目等參數之霧粒沉積分佈影像圖鑑或樣本的比對與操作訓練，因分界值選定的誤差將會少於5%[6]。

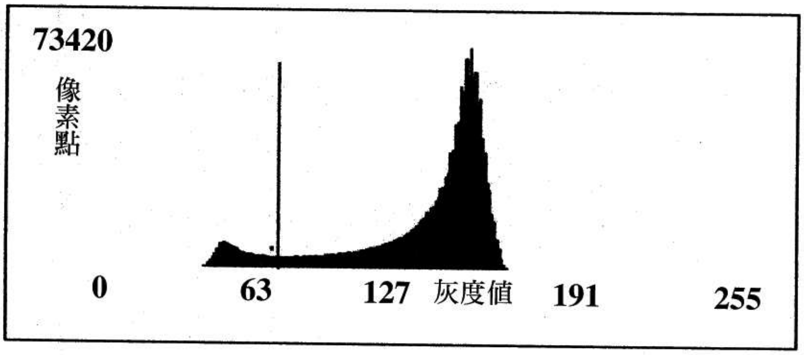


圖2. 分成兩個族群的灰階分佈統計直方圖。

Fig. 2. The gray level histogam of the two separated groups.

本實驗找分界值之方法是先對標準圖鑑的霧粒影像圖進行分析及進行分界值的判讀訓練，以找出在不同霧粒粒徑、覆蓋率、霧粒密度等條件下的分界值選定值，再於相同條件下進行本實驗所獲得的水試紙樣本進行分界值的選定，其方法仍以以統計圖法找出分界值的大概位置，經影像二值化後再視影像的完整性及雜訊的情況作調整，所選定的分界值再與上述方法得到分界值參考進行比對，直到所設定的分界值能得到最接近眞實的影像爲止。另分界值的選定可應用影像中，物體與背景的邊界特性如利用梯度與Laplacian運算而得到最佳的分界值，這是本實驗未來的研究重點方向。

(五)影像演算法

影像處理方法中常利用標記法來計算物體的數目與面積[4,7]，因此本研究應用標記法來計算水試紙上的霧粒數目與面積。若以４相連標計法(labeling of 4-connectivity)來計算每一區域的面積，其方法以圖3、圖4敘述如下：圖3爲10×10的二值化影像f(x,y)，以０代表背景，以１代表物體；則將影像中凡具有4相連關係的任意兩個像素標記成同一個區域，其偵測方法是由左至右，由上至下掃描每一個像素，當像素f(x,y)之値是1時，立刻再判斷該像素的左邊及上方之像素，則可能有下列的情形出現：

(1) 當f(x-1,y)=f(x,y-1)=０時，表示出現新的區域，因此區的累計數加１，並將該像素的値加１。

(2) 當f(x-1,y)或f(x,y-1)只有一個爲０時，則令f(x,y)等於不爲0的像素點之値。

(3) 當f(x-1,y)=f(x,y-1)= n 時，則令f(x,y)＝ n 。

(4) 當f(x-1,y)=n1，f(x,y-1)=n2且n1(n2時，令f(x,y)=n2，並記錄n1與n2是等價。

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	1	1	1	0
0	1	1	0	0	0	1	1	1	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
0	1	1	1	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

圖3. 10×10的二値化數位影像。

Fig. 3. The digital image of the 10x10 binary values.

0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	2	2	2	0
0	1	1	0	0	0	2	2	2	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	3	3	0	4	0
0	5	0	6	0	3	3	0	4	0
0	5	0	6	0	3	0	0	4	0
0	5	0	6	0	0	0	7	4	0
0	5	5	6	0	0	0	7	4	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

圖4. 圖3影像經過第一次掃描後之標記値結果。

Fig. 4. The result of the first scanning image for Fig. 3.

圖4爲經掃描一次結束後的結果，可由圖中看出初步掃描可以得到7個區域，正確的標記必須經過第二次掃描將等價的區域(例如5與6；4與7)合併起來。因此，只要計算每種灰度値個別的像素數目，即可算出每個霧粒的個別面積和霧粒數目。圖5爲影像掃描器所擷取的霧粒影像；圖6爲利用標記法理論所得到的影像，不同附著程度的霧粒以不同的灰階値加以標記。

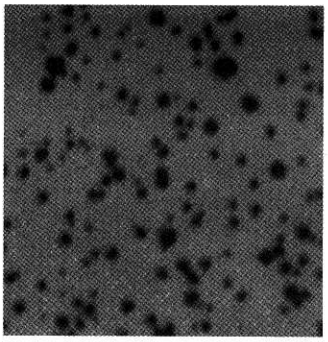


圖5. 影像掃描器所擷取的霧粒影像。

Fig. 5. The image of the spray depositoin taken by the scanner.

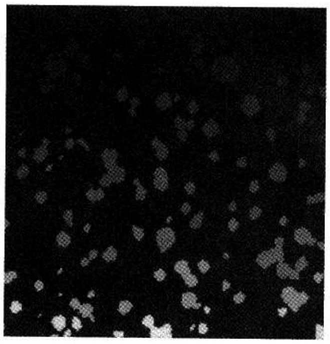


圖6. 利用標記法所得到的影像。

FIg. 6. The image gained by the labeling method.

(六) 霧粒沉積覆蓋率的計算

霧粒沉積覆蓋率(或稱爲附著度)爲評估噴霧目的物上被藥劑所覆蓋的面積百分率，霧粒沉積覆蓋率可利用右式來計算(3)：C= $\frac{P_d}{P_t}$ ×100％其中 C爲覆蓋率(％)，Pt爲水試紙取樣範圍內總影像點數(取樣總面積)，單位爲pixel；Pd爲取樣範圍內霧粒所佔的影像點數(變色部份所佔面積)，單位爲pixel。

結果與討論

一、水試紙取像結果

圖7與圖8爲在不同的噴霧條件下，GT-6500影像掃描器所擷取之影像結果。

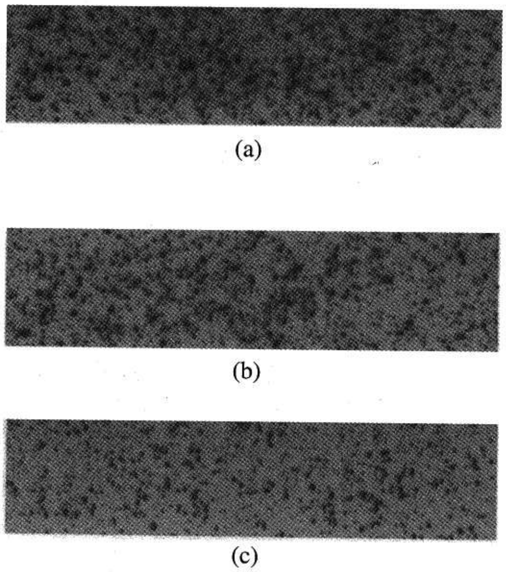
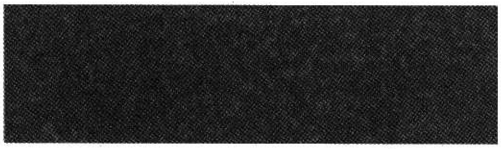


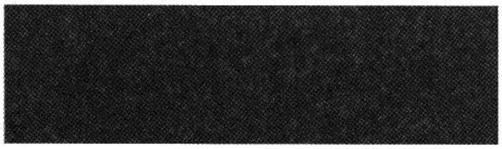
圖7. 液體壓力爲2kg/cm^2，行進速度爲9.82km/hr，噴灑高度爲(a)50cm (b)80cm (c)110cm之噴霧條件下的霧粒沉積情形。

Fig. 7. The spray deposition under the condition of 2 kg/cm^2 pressure and 9.82km/h forward speed at spray height of (a)50cm (b)80cm (c)110cm.



(a)

(b)



(c)

圖8. 液體壓力爲$8kg/cm^2$，行進速度爲3.27km/hr，噴灑高度爲(a)50cm (b)80cm (c)110cm之噴霧條件下的霧粒沉積情形。

Fig. 8. The spray deposition under the condition of kg/cm^2 pressure and 3.27km/h forward speed at spray height of (a)50cm(b)80cm(c)110cm.

二、影像分割結果

影像二值化使用的分界值係參考灰階統計圖，並配合原霧粒影像的觀察而調整。若分界值設定太大，則霧粒影像的背景雜訊會出現且霧粒粒徑顯然比實際值大且有許多霧粒造成相連的現象；分界值若設定太小，則會使霧粒粒徑顯然的比實際值小甚至許多微小霧粒會消失而影響到密度及粒徑的準確度。

圖9爲水試紙經影像掃描器數位化成256個灰階所得到之霧粒沉積分佈情形影像，影像數位化以後則利用前面所提到的分界值法進行霧粒影像的分割。圖10爲圖9用分界值法所分割出的二值化影像圖。

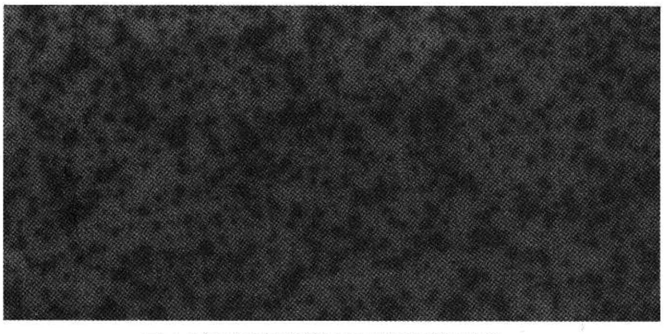


圖 9. 影像掃描器所掃描得到之霧粒影像。

Fig. 9. The spray image gained by the scanner.

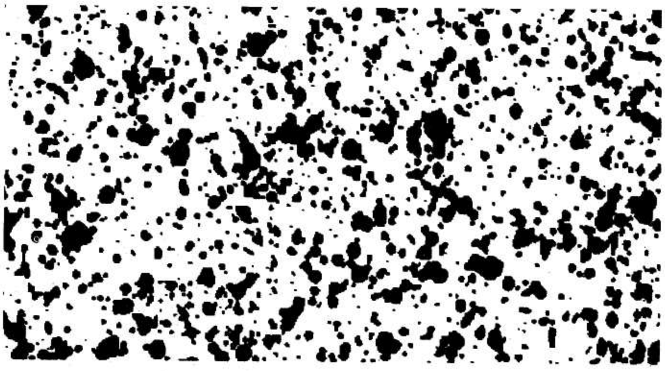


圖10. 用分界值64分割的結果。

Fig. 10. The result of fig. 9 segmented by threshold 64.

三、 霧粒沉積覆蓋率的量測結果

按前述的方法來量測水試紙上的霧粒影像資料後，霧粒沉積覆蓋率以$C=\frac{P_d}{P_t}\times 100\%$之公式計算則可得表2之結果。

表2. 噴霧試驗樣本霧粒沉積覆蓋率量測結果

Table 2. The results of the spray deposition coverage on water sensitive paper

液體壓力 (kg/cm^2)	噴灑高度行 (cm)	進速度沉 (km/hr)	積覆蓋率 (%)
2	50	3.27	42.91
2	80	3.27	26.33
2	110	3.27	20.91
5	50	3.27	60.37
5	80	3.27	42.22
5	110	3.27	36.56
8	50	3.27	73.77
8	80	3.27	49.02
8	110	3.27	43.24
2	50	6.54	20.29
2	80	6.54	12.45
2	110	6.54	9.82
5	50	6.54	38.40
5	80	6.54	23.36
5	110	6.54	12.10
8	50	6.54	51.23
8	80	6.54	28.53
8	110	6.54	14.47
2	50	9.82	19.48
2	80	9.82	16.13
2	110	9.82	12.80
5	50	9.82	29.04
5	80	9.82	19.27
5	110	9.82	13.32
8	50	9.82	44.75
8	80	9.82	27.33
8	110	9.82	22.93

爲了解所有變數對噴霧沉積覆蓋率的影響，應用Statgraphics(STSC，Inc.)統計軟體來進行95％信賴水準之多因子變方分析(multifactor analysis of variance)，其分析結果列於表3。由表3可清楚看出三個主要因子：噴霧液體壓力(spraying pressure，SP)、噴頭距目標物高度(spraying height，SH)與目標物之行進速度(travel speed，TS)，以及三個交感作用，在統計分析上是顯著的。圖11至圖13顯示三個極顯著主要因子基於95％信賴區間對於噴霧沉積覆蓋率之平均值圖。圖11中，基於Duncan 多重範圍分析(multiple range analysis)可知，隨著噴霧液體壓力之增加而有較高的噴霧沉積覆蓋率。噴霧壓力2kg/cm^2、5kg/cm^2 與8kg/cm^2可分別看成個別之群組。相反地，圖12顯示隨著噴頭高度之增加噴霧沉積覆蓋率反而降低，而試驗所用之三水準亦可看成個別之群組。類似地，圖13顯示隨著行進速度之增加，噴霧沉積覆蓋率則因之降低，基於多重範圍分析可知行進速度3.27km/hr與另一群行進速度爲6.54km/hr與9.82km/hr時相較噴霧沉積覆蓋率顯然較高，而當行進速度大於6.54km/hr時噴霧沉積覆蓋率受行進速度影響便減少而不見顯著之差異。

表3. 噴霧沉積覆蓋率基於噴霧條件之變方分析

Table 3. The variance analysis of the spray coverage based on spraying conditions

Source of variance	Sum of quares	Degree of freedom	Mean square	F-ratio	Significant level
Main effects					
SP	1687.9781	2	843.9891	137.956	0.0000
SH	2202.9396	2	1101.4698	180.043	0.0000
TS	2605.3534	2	1302.6767	212.932	0.0000
Interaction					
SP×SH	227.26864	4	56.817159	9.287	0.0042
SP×TS	134.94157	4	33.735393	5.514	0.0197
SH×TS	129.34575	4	32.336437	5.286	0.0222
Residual	48.942385	8	6.1177981		
Total	7036.7694				

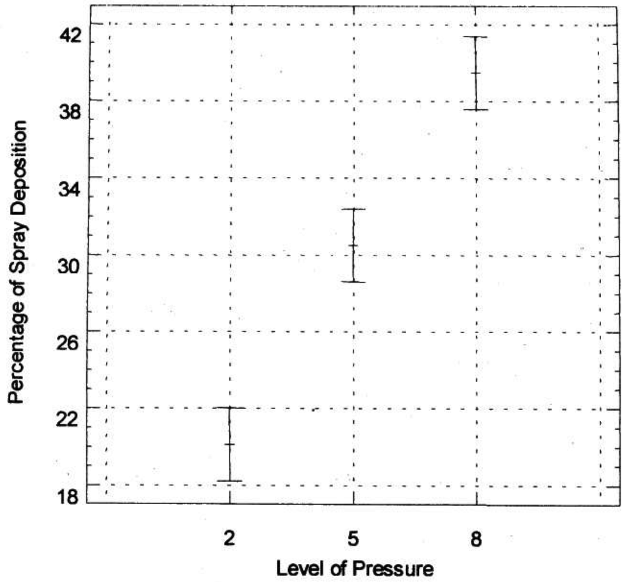


圖11. 不同噴霧壓力下噴霧沉積覆蓋率95%信賴水準之平均值圖。
Fig. 11. 95% confidence intervals for factor means plot of spray deposition for various spraying pressures.

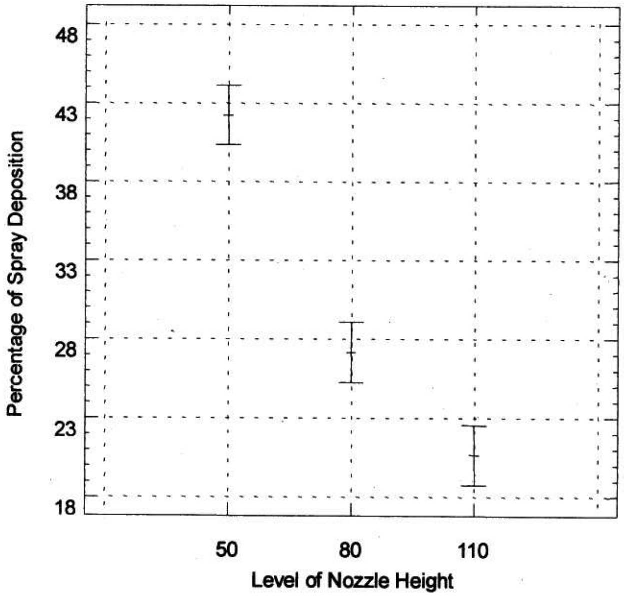


圖12. 不同噴霧高度下噴霧沉積覆蓋率95%信賴水準之平均值圖。
Fig. 12. 95% confidencl intervals for factor means plot of spray deposition for various spraying heights.

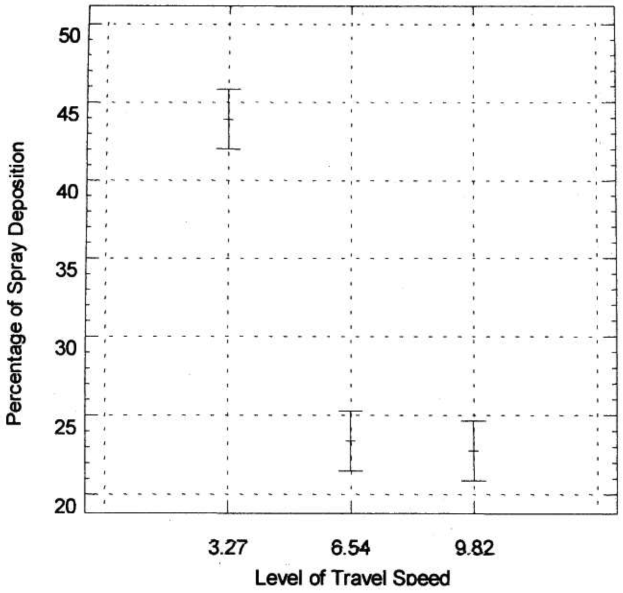


圖13. 不同行進速度下噴霧沉積覆蓋率95%信賴水準之均値圖。

Fig. 13. 95% confidence intervals for factor means plot of deposition for various spraying pressures.

進一步之交感分析更深入地肯定前述主要效果分析之發現，茲將三顯著交感作用以圖14、15與16逐一敘述如下：圖14顯示，如主要效果分析之發現，噴霧壓力愈大噴霧沉積覆蓋率也愈大，而隨著每一個固定噴霧壓力之曲折線，噴霧沉積覆蓋率隨著噴霧高度之提高而降低。圖15顯示噴霧壓力與行進速度對於噴霧沉積覆蓋率之交感作用分析，同樣地，噴霧壓力愈大噴霧沉積覆蓋率也愈大，但隨著每一固定噴霧壓力之曲折線，噴霧沉積覆蓋率於行進速度爲3.27㎞/hr時爲最高，並隨著行進速度之增加而逐漸降低，惟行進速度超過6.54㎞/hr以上時，噴霧沉積覆蓋率的變化則不明顯。相似的情形，在圖16噴頭距目標物高度與行進速度對噴霧沉積覆蓋率之交感作用中所顯示，噴頭高度愈大噴霧沉積覆蓋率反而愈小，而隨著每一固定噴頭距目標物高度之曲折線，噴霧沉積覆蓋率於爲最高行進速度爲3.27㎞/hr時爲最高，並隨著行進速度之增加而逐漸降低，惟行進速度超過6.54㎞/hr以上時，噴霧沉積覆蓋率的變化也不明顯。

綜合上述分析可知，噴霧沉積覆蓋率係隨噴霧壓力之增加而增加，但卻隨噴頭高度之增加而減少；噴霧沉積覆蓋率亦隨著噴霧行進速度之增加而減少，但於行進速度達6.54㎞/hr以上時則因高速影響而不再有顯著差異，此結果所顯現噴霧條件對噴霧沉積覆蓋率之影響趨勢與前人研究成果相當吻合[8,8,9,10,11,12]。爲尋找一簡單方程式以表示各噴霧條件對噴霧沉積覆蓋率之影響，表2之試驗結果被以Statgraphics軟體之逐步迴歸(stepwise regression)程序加以分析，結果噴霧沉積覆蓋率(POD)可表示成：

$$POD = 14.5424P + 0.14802H - 0.0908PH - 0.56842PT$$

$$R^2 = 0.95609$$

其中P爲噴霧液體壓力，單位kg/m^2；H爲噴頭距目標物高度，單位cm；T爲行進速度，單位㎞/hr。由此式可知，雖只有兩主要因子與兩交感作用併入此式，但已有0.95609之判定係數，顯示所選之兩主

要因子與兩交感作用對噴霧沉積覆蓋率已有充分之解釋能力。

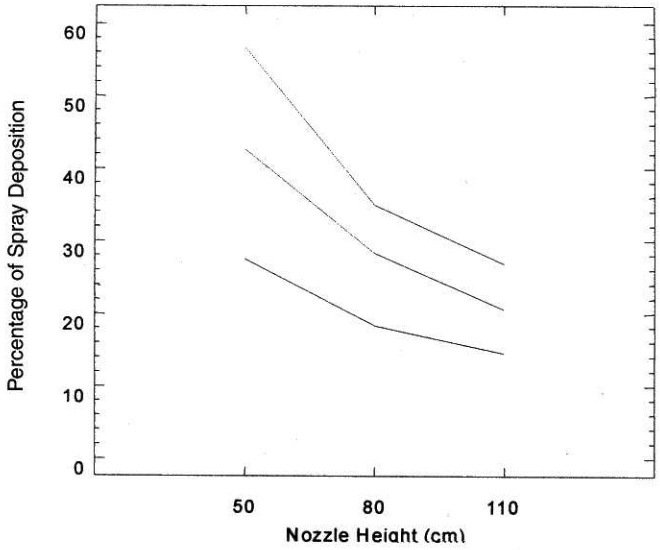


圖 14. 噴霧壓力與噴霧高度對於噴霧沉積覆蓋率之交感作用。
Fig. 14. Interactions for spraying pressures by spraying heighte for the percentage of spray deposition.

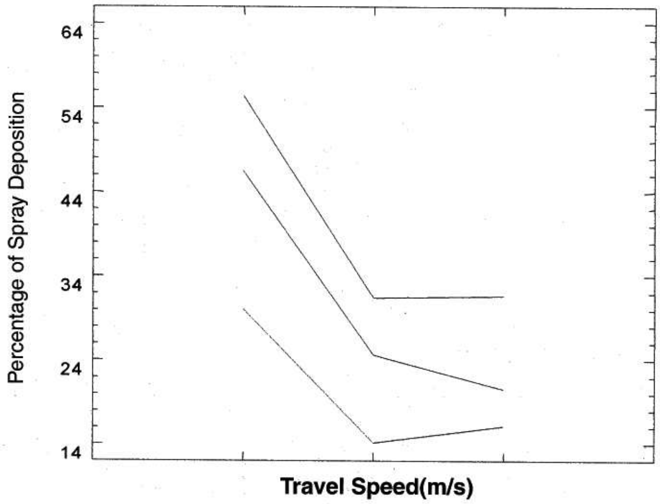


圖 15.噴霧壓力與行進速度對於噴霧沉積覆蓋率之交感作用。
Fig. 15. Interactions for spraying pressures by travel speeds for the percentage of spray deposition.

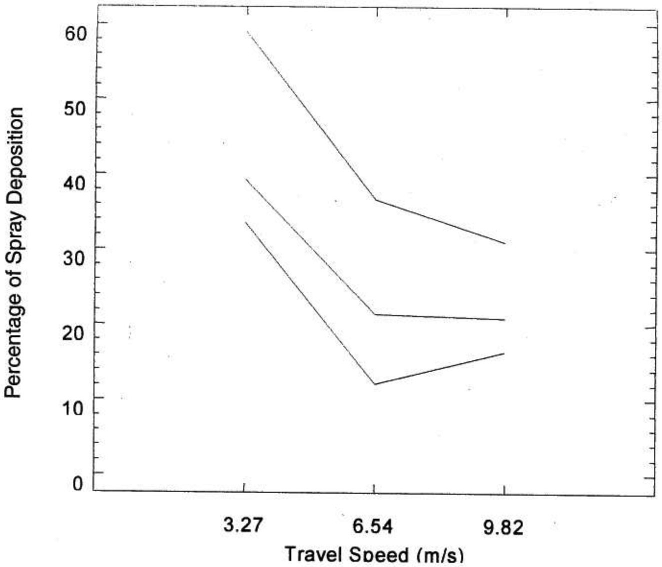


圖16 噴霧高度與行進速度對於噴霧沉積覆蓋率之交感作用。
Fig. 16. Interactions for spraying hights by travel speeds for the percentage of spray deposition.

本研究應用影像運算處理技術配合水試紙的使用，已建立一套可以快速且正確的分析及量化噴霧機噴霧性能的影像處理系統，此系統雖可量測其他噴霧品質如霧粒分佈密度、霧粒數目、霧粒覆蓋率、粒徑分佈範圍等參數，惟本研究只探討相關變數對霧粒沉積覆蓋率之影響，其他參數之分析技術值得未來進一步探究。

誌 謝

本試驗承蒙本所農業工程系副研究員蔡致榮博士提供Statgraphics(STSC，Inc.)軟體及協助分析，謹誌謝忱。

引用文獻

1. 李芳繁。1990。以影像處理量測檸檬之幾何性質。中國農業工程學報 36(3)：36-42。
2. 邱相文、梁連勝、陸龍虎。1997。自動化施藥機械之研製與改良。八十五年農機研究發展與示範推廣報告(上冊)：191-193。
3. 邱相文。1997。影像處理技術應用於噴霧沉積之分析研究。國立中興大學農業機械工程研究所碩士論文。
4. 林宜弘。1995。機器視覺應用在魚苗計數之可行性研究。農業機械學刊 4(2)：37-45。
5. Ciga-Geigy Ltd. Water-sensitive paper for monitoring spray distribution. 4th Edition. Ciba-Geigy Ltd, Switzerland.
6. Franz, E. 1992. A simple spray coverage analyer. ASAE Paper No. 92-1617, St. Joseph, MI：ASAE.
7. Gonzalez,R.C., and Richard E. Woods. 1993. Ditigal Image Processing. Addision Wesley Publishing Company.
8. Last, A.J., C. S. Parkin, and R.H.Beresford. 1987. Low-cost digital image analysis for the evaluation of aerial applied pesticide deposits. Computers and Electronics in Agriculture. 1：349-362。
9. Panneton, B., and A.M. Drummond. 1991. Digital image analysis of spray sample. Applied Engineering in Agriculture. 7(2)：273-278.

10. Salyani, M., and R.D.Fox. 1994. Performance of image analysis for assessment of simulated spray droplet distribution. Transactions of the ASAE 37(4)：1083-1089.

11. Sistler, Fred E., Powers A. Smith., and Darryl C. Rester. 1982. An image analyzer for aerial application patterns. Transactions of the ASAE 25(4)：885-887.

12. Staniland, L. N. 1959. Fluorescent tracer techniques for the study of spray and dust deposits. J. Agric. Eng. Res. 4(2)：110-125.

13. Yates, W. E., and N. B. Akesson 1973. Reducing pesticide chemical drift. Pesticide formulations. Transactions of the ASAE 17(4)：627-632.

Using Image Processing Technique to Measure Spray Coverage[1]

Hsiang-Wen Chiu[2], Fang-Fan Lee[3] and Lien-Sheng Liang[2]

Summary

This study used an image processing method to analyze spray depositions on water-sensitive paper. A scanner was used to transfer the image deposited on water-sensitive paper in this study. To measure the efficiency of the spray machine, water-sensitive paper analysis is the simplest method. This study used water sensitive paper to collect the spray depositions and a scanner to digitize the spray depositions into image information. Image processing technologies were then applied to analyze the depositions, and thresholding was used to segment the object from the background. Labeling scheme was used to count the number of droplets. Using image processing we can determine droplet size distribution, coverage density, and the percentage of the coverage. The results of this study revealed the feasibility in using image processing algorithms to extract deposit features and measure the target area covered by the deposits. The percent area covered as measured by image analysis decreased as spray height or spray speed increased or hydraulic pressure decreased. The advantages of image processing techniques applied to analyze spray deposition are increasing the speed of analysis and reducing the labor involved. In addition, image processing methods can describe the spray deposition and quantify feature terms.

Key words：Image processing, Spray coverage.

1. Contribution No.2004 from Taiwan Agricultural Research Institute, Council of Agriculture.

2. Respectively, Assistant, Senior Engineer and Head of the Department of Agricultural Engineering, TARI, Wufeng, Taichung, R.O.C.

3. Professor of the Department of Agricultural Machinery Engineering, National Chung-Hsing University.Taichung, R.O.C.

中　華　農　業　研　究

第四十八卷　　第四期

中華民國八十八年十二月出版

發 行 人：林 俊 義
總 編 輯：陳 炳 輝
編審委員：
農藝組：盧 煌 勝（主審）
王 強 生　呂 秀 英　郭 益 全　陳 一 心
楊 純 明　劉 大 江　劉 新 裕　蔡 新 聲
園藝組：蕭 吉 雄（主審）
王 德 男　施 昭 彰　徐 信 次　劉 政 道
歐 錫 坤
農化組：林 木 連（主審）
王 鐘 和　吳 繼 光　郭 鴻 裕　劉 慧 瑛
植病組：彭 金 騰（主審）
安 寶 貞　林 正 忠　張 清 安　程 永 雄
蔡 武 雄
昆蟲組：羅 幹 成（主審）
王 清 玲　何 琦 琛　周 樑 鎰　陳 炳 輝
陳 健 忠　鄭　　允　鄭 清 煥
農機組：梁 連 勝（主審）
黃 禮 棟　賴 建 州　蔡 致 榮

另聘請農業評議委員或各大學院校有關學者專家擔任審查委員。

Vol. 48, No.4 Dec. 1999

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH OF CHINA

PUBLISHER : Chien-Yih Lin

EDITOR IN CHIEF : Bing-Huei Chen

EDITORIAL BOARD :

Chi-Hsiung Hsiao (Horticulture)
Mu-Lien Lin (Agri. Chemistry)
Lien-Sheng Liang (Agri. Engineering)
Kang-Chen Lo (Applied Zoology)
Hung-Shung Lu (Agronomy)
Jin-Torng Peng (Plant Pathology)

EDITORIAL ADVISORY BOARD :

Pao-Jin Ann
Chien-Chung Chen
Edward Yun Cheng
Horng-Yuh Guo
Li-Duhng Huarng
Cheng-Chung Lin
Huey-Ing Liu
Shyi-Kuan Ou
Hsin-Sheng Tsay
Chong-Ho Wang
Chi-Guang Wu
Chin-An Chang
Yi-Shin Chen
Yung-Hsiung Cheng
Chyi-Chen Ho
Yih-Chuan Kuo
Tsung-Dao Liou
Sin-Yie Liu
Jau-Chang Shih
Jyh-Rong Tsay
Chin-Ling Wang
Chwen-Ming Yang
Bing-Huei Chen
Ching-Huan Cheng
Liang-Yih Chou
Hsin-Tszu Hsu
Chien-Chou Lai
Dah-Jiang Lin
Hsiu-Ying Lu
Wu-Hsiung Tsai
Chan-Sen Wang
Der-Nung Wang

Reviewers of related fields are invited from universities, and other research organizations.

統一編號
030853880023

Vol. 48, No.4 Dec. 1999

行政院新聞局出版事業登記證局版臺省誌字第二九八號
中華郵政中臺字第〇三〇九登記為雜誌交寄

JOURNAL OF AGRICULTURAL RESEARCH OF CHINA

(Formerly Journal of Taiwan Agricultural Research)

CONTENTS

Studies on Varietal Characters, Production Potential, Phytochemical Properties, and Antioxidant Effect of *Dioscorea* spp. ····················Sin-Yie Liu, Torng-Wu Chang, Yi-Kung Lin, Su-Feng Chen, Jan-Yueh Wang, Gean-Liang Zu, and Shun-Cheng Wang ············ 1

Observation of Fruit Anatomy and Development of Bitter Gourd I.Fruit Anatomy and Fertilization of Bitter Gourd ······You-Ming Chang, Pan-Chi Liou, Chi-Hsiung Hsiao and Chou-Tou Shii ······ 23

Induction of Morphological Variants from Stem Node Explants of *Philodendron* after Treatment with γ-rays ····························Uei-Chin Chen, Yih-Juh Shiau and Hsin-Sheng Tsay ······ 32

Studies on Tissue Culture of *Heliconia psittacrum* cv. Rhizomatosa Ⅲ.Effect of Cefotaxime and Plant Growth Regulators on Growth of Shoot Tip Explants *in Vitro*···Yih-Juh Shiau, Tsai-Yih Wang, and Hsin-Sheng Tsay ······ 42

Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers for Identification and Genetic Diversity Analysis of *Anthurium* Cultivars ······················ Jau-Yueh Wang, Keng-Chang Chuang and Ming-Jen Fan ······ 52

Effects of Peat Moss Amendment on Propagation of Arbuscular Mycorrhizal Fungus ······························ Ming-Fuh Chuang and Yung-Hsiung Cheng······ 64

Screening of Peppers for Resistance to Bacterial Wilt Caused by *Ralstonia solanacearum* ·········Chien-Yih Lin, Shiow-Huey Hseu, San-Tai Wang, Shing-Jy Tsao, Jyh-Herng Yen, and Chi-Hsiung Hsiao ··· ··· 71

Study on Cross-resistance between BPU-type IGRs and Other Insecticides Including *Bacillus thuringensis* and Abamectin in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* L.······················ Ching-Hua Kao and Edward Y.Cheng······84

Using Image Processing Technique to Measure Spray Coverage ······················Hsiang-Wen Chiu, Fang-Fan Lee and Lien-Sheng Liang ······96

Published by

THE TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH INSTITUTE

COUNCIL OF AGRICULTURE

Taichung, Taiwan, Republic of China